

ELEKTROFUSION UND ENUKLEATION
VON BLASTOMEREN
BEI SÄUGETIEREMBRYONEN

Annette Clement-Sengewald

Disbui. München

1988



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555208_0002



Aus dem Institut für Tierzucht und Tierhygiene
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht:
Prof. Dr. Dr. habil. G. Brem

ELEKTROFUSION UND ENUKLEATION VON BLASTOMEREN BEI SÄUGETIEREMBRYONEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Annette Clement-Sengewald
aus
Stuttgart

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Prof. Dr. Dr. habil. G. Brem

Korreferent: Prof. Dr. W. Klee

Tag der Promotion: 29. Juli 1988

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AZ	Achtzeller
B	Blastozyste
BSA	Bovines Serum Albumin
BSM 2	Basal Synthetic Medium
Cyto D	Cytochalasin D
deg.	degeneriert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DZ	Dreizeller
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Empf.	Empfänger
en.	enukleiert
Fa.	Firma
FKS	Fetales Kälberserum
FM	Frühe Morula
fus.	fusioniert
ges.	gesamt
HVJ	Haemagglutinating Virus of Japan
ICM	Inner cell mass
I.U.	International Units
KM	Kompaktierte Morula
Ko.	Kontrollen
Kontr.	Kontrollen
LS	Lammserum
M	Morula
MEM	Modifiziertes Eagle Medium
M 2	Modifizierte Krebs-Ringer-Lösung
PA	Pulsanzahl
PBS	Phosphate-Buffered-Saline Dulbecco
PD	Pulsdauer
PEG	Polyethylenglycol
PS	Pulsstärke
SMMP	Salt Mimimal Medium with Phosphate
sy.	synchron
SZ	Sechszeller

Tab.	Tabelle
TL Hepes	Hepes-buffered modified Tyrodes medium
transf.	transferiert
VZ	Vierzeller
ZZ	Zweizeller
2n/4n-Mosaik	diploid-tetraploid-Mosaik
>4n-Embryo	Mehrzeller, bei dem mehr als 2 Blastomeren miteinander fusioniert sind

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG	1
2. LITERATUR	3
2.1 Zellfusion	3
2.1.1 Mechanismus der Fusion	3
2.1.2 Fusionsmethoden	4
2.1.2.1 Polyethylenglycol (PEG)	4
2.1.2.2 Inaktivierte Sendaiviren	7
2.1.2.3 Lysolecithin	12
2.1.2.4 Weitere Fusionsmethoden	13
2.1.3 Elektrofusion	14
2.1.3.1 Entwicklung	14
2.1.3.2 Mechanismus	16
2.1.3.3 Technik	19
2.1.3.4 Anwendung	22
2.1.3.4.1 Lipidmembranen und Liposomen	22
2.1.3.4.2 Bakterien und Hefen	22
2.1.3.4.3 Pflanzen	27
2.1.3.4.4 Hybridomazellen	27
2.1.3.4.5 Oozyten, Blastomeren, Kerne	29
2.1.3.5 Einsatzmöglichkeiten der Fusion	38
2.2 Kerntransfer	40
2.2.1 Entwicklung	40
2.2.2 Technik	41
2.2.3 Anwendung des Kerntransfers bei Säugetieren	45
2.3 Diploid-Tetraploidie	52
2.3.1 Tetraploide Zellen	52
2.3.2 Erstellung von diploid-tetraploid-Mosaiken	53
2.3.3 Erstellung von diploid-tetraploid-Chimären	55

3. MATERIAL UND METHODE	57
3.1 Tiermaterial und Embryonengewinnung	57
3.1.1 Mäuse	57
3.1.2 Kaninchen	59
3.1.3 Schweine	60
3.2 Elektrofusion	61
3.2.1 Herstellung der Fusionskammern	61
3.2.2 Embryonenvorbereitung	62
3.2.3 Fusionsversuche	63
3.2.4 Embryonenbeurteilung	66
3.3 In vitro Kultur von fusionierten Embryonen und Kontrollembryonen	68
3.4 In vivo Entwicklung von fusionierten Embryo- nen und Kontrollembryonen	70
3.4.1 Maus	70
3.4.2 Kaninchen	71
3.5 Enukleation fusionierter Zweizellembryonen	73
3.5.1 Herstellung der Enukleationspipetten	73
3.5.2 Embryonenvorbereitung	74
3.5.3 Enukleationsversuche	74
3.6 Untersuchung geborener Jungtiere	77
3.6.1 Probenaufbereitung	77
3.6.2 DNA-Messung	79
4. ERGEBNISSE	80
4.1 Zweizellembryonen	80
4.1.1 Maus	80
4.1.1.1 Elektrofusion	80
4.1.1.1.1 Einfluß der Superovulation	80

4.1.1.1.2	Einfluß der Alignmentdauer	81
4.1.1.1.3	Einfluß des Duty cycle	82
4.1.1.1.4	Einfluß der Verwendung verschiedener Kultur- medien vor und nach der Fusionsauslösung	83
4.1.1.1.5	Einfluß der Pulsanzahl	85
4.1.1.1.6	Einfluß der Pulsdauer	86
4.1.1.1.7	Einfluß der Pulsstärke	88
4.1.1.1.8	Einfluß verschiedener Kombinationen aus Puls- anzahl, Pulsdauer und Pulsstärke	89
4.1.1.2	In vitro Kultur fusionierter Zweizellembryonen	92
4.1.1.3	In vivo Kultur fusionierter Zweizellembryonen	94
4.1.2	Kaninchen	97
4.1.2.1	Elektrofusion	97
4.1.2.2	In vitro Kultur fusionierter Zweizellembryonen	100
4.1.2.3	In vivo Kultur fusionierter Zweizellembryonen	100
4.1.3	Schwein	101
4.1.3.1	Elektrofusion	101
4.1.3.2	In vitro Kultur fusionierter Zweizellembryonen	103
4.2	Mehrzellembryonen	104
4.2.1	Maus	104
4.2.1.1	Elektrofusion	104
4.2.1.1.1	Einfluß der Alignmentdauer	106
4.2.1.1.2	Einfluß der Pulsanzahl	107
4.2.1.1.3	Einfluß der Pulsdauer	109
4.2.1.1.4	Einfluß der Pulsstärke	110
4.2.1.2	In vivo Kultur von diploid-tetraploid-Mosaiken	111
4.2.2	Kaninchen	113
4.2.2.1	Elektrofusion	113
4.2.2.1.1	Einfluß der Alignmentdauer	115
4.2.2.1.2	Einfluß der Pulsanzahl	116
4.2.2.1.3	Einfluß der Pulsdauer	117
4.2.2.1.4	Einfluß der Pulsstärke	118
4.2.2.2	In vivo Kultur von diploid-tetraploid-Mosaiken	119
4.2.2.3	Untersuchung der geborenen Jungtiere aus Transfers von fusionierten Mehrzellembryonen	121

4.3	Enukleation fusionierter Zweizellembryonen und Kultur von fusionierten enukleierten Zweizellembryonen	129
4.3.1	Enukleation fusionierter Zweizellembryonen	129
4.3.2	In vitro Kultur fusionierter und enukleierter Zweizellembryonen	130
4.3.3	In vivo Kultur fusionierter und enukleierter Zweizellembryonen	132
5.	DISKUSSION	135
5.1	Zweizellembryonen	135
5.1.1	Elektrofusion	135
5.1.2	Kultur fusionierter Zweizellembryonen	145
5.1.3	Enukleation fusionierter Zweizellembryonen	151
5.2	Mehrzellembryonen	154
5.2.1	Elektrofusion	154
5.2.2	Kultur fusionierter Mehrzellembryonen	157
5.2.3	DNA-Messung	158
5.3.	Ausblick	160
6.	ZUSAMMENFASSUNG	162
7.	SUMMARY	164
8.	LITERATURVERZEICHNIS	166

1. EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG

Ziel der Tierzucht ist es, Eigenschaften und Leistungen landwirtschaftlicher Nutztiere in die gewünschte Richtung genetisch zu verändern. Seit Einsatz des Embryotransfers steht eine Züchtungstechnik zur Verfügung, die über eine Verbesserung der Selektionsintensität eine Steigerung des Zuchtfortschrittes ermöglicht. Die mikrochirurgische Teilung von Embryonen und die künstliche Erstellung monozygoter Zwillinge erweitert das Spektrum der züchterischen Anwendungsmöglichkeiten (BREM, 1986). Da Embryonen jedoch nicht mehrmals erfolgreich geteilt werden können, muß ein anderer Weg eingeschlagen werden, um eine größere Zahl genetisch identischer Tiere (Klone) zu erzeugen. Ein aussichtsreicher Weg könnte in dem Transfer von Zellkernen aus Blastomeren früher Embryonalstadien in Oozyten oder enukleierte Zygoten bestehen.

Seit der Entwicklung der Elektrofusion Ende der siebziger Jahre steht eine Methode zur Verfügung, die die Wiedereinbringung entnommener Zellkerne in Empfängerzellen im Vergleich zu anderen Methoden erleichtert und zu deutlich besseren Überlebensraten führt.

Mit Hilfe der Elektrofusion gelangen WILLADSEN (1986) erste Klonierungsexperimente beim Schaf. Die erfolgreiche Klonierung von Rindern wird nach Versuchen von BARNES et al. (1987) in naher Zukunft für aussichtsreich gehalten (MARX, 1988). Neben der Steigerung des Zuchtfortschrittes eröffnet die Klonierung von Tieren eine Reihe weiterer züchterischer Möglichkeiten, so unter anderem die Untersuchung von Genotyp-Umwelt-Interaktionen, maternalen Effekten oder Krankheitsdispositionen an genetisch identischen Tieren (BREM, 1986).

Die Elektrofusion ermöglicht neben Kerntransferexperimenten zusätzlich die Veränderung der Ploidie von Zellen. Tetraploide Embryonen oder diploid-tetraploid-Mosaike sind Modelle zur Erforschung tetraploider Zellen. Mit Hilfe tetraploider Zel-



len könnten zum Beispiel Gen-Dosis-Effekte untersucht werden. Darüber hinaus wäre von Interesse, ob aus den in die Keimbahn gelangten tetraploiden Zellen diploide Gameten hervorgehen und welche Konsequenzen sich daraus für die Fortpflanzung und Vererbung ergeben würden.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, Fusionsparameter für die Elektrofusion zu ermitteln, mit denen tetraploide Embryonen durch Fusion von Zweizellembryonen und diploid-tetraploid-Mosaike durch Fusion weniger Blastomeren eines mehrzelligen Embryos erstellt werden können. Darüberhinaus sollte die Entwicklung der erstellten Tiere in vitro und in vivo verfolgt werden.

Durch die Enukleation von fusionierten Zweizellembryonen sollte ein neuer Weg zur Schaffung genetisch identischer Tiere untersucht werden. Wenn fusionierte, enukleierte Zweizellembryonen überlebenlebensfähig sind, können durch die Enukleation fusionierter Zweizellembryonen mit gleichzeitigem Transfer des entnommenen Kernes auf eine Empfängerzelle Zwillingsembryonen erstellt werden. Die Kultivierung der entstandenen Zwillingsembryonen bis zum Zweizellstadium und die erneute Elektrofusion und Enukleation eines Kernes würde wiederum den erneuten Transfer von zwei Kernen auf Empfängerzellen ermöglichen. Wie oft dieser Vorgang wiederholt werden kann, ist von der Differenzierung der Zellkerne abhängig.

Die Elektrofusionsversuche wurden an Mäuse-, Kaninchen- und Schweineembryonen durchgeführt. Für die Enukleationsversuche wurden ausschließlich Mäuseembryonen verwendet.

2. LITERATUR

2.1 ZELLFUSION

Unter Zellfusion versteht man die spontane oder induzierte Verschmelzung von zwei oder mehr Zellen zu einer einzigen Zelle. Während die Zellfusion immer die Fusion von Membranen beinhaltet, führt eine Membranfusion nicht immer zu Zellfusionen. In der Natur kommen Zellfusionen unter anderem bei Makrophagen (PAPADIMITRIOU, 1978), bei der Entstehung von Muskelfasern, bei der Entartung von Gewebe und bei der Befruchtung vor (BROCKMANN, 1985). Die Fertilisation kann als eine Abfolge von vier aufeinander abgestimmten Membranfusionsprozessen verstanden werden: erstens der Akrosomenreaktion (Exozytose), zweitens der Membranfusion von Spermium und Eizelle, drittens der kortikalen Reaktion (Exozytose) und viertens der Fusion der Vorkerne von Samen- und Eizelle (EPEL und VACQUIER, 1978). SOUPART (1980) beschreibt die spezifische Produktion von einem oder mehreren membranfusionierenden Agenzien durch das Spermium, welche die Membranfusion von Spermium und Oozyte erst ermöglichen.

2.1.1 Mechanismus der Zellfusion

Die Zellfusion ist gekennzeichnet durch die Verschmelzung von Zellmembranen (BROCKMANN, 1985). Voraussetzung für die Fusion von Membranen ist deren enge Aneinanderlagerung (AHKONG et al., 1975). Durch Strukturveränderungen werden die Membranen in den Fusionsprozeß einbezogen, wobei zahlreiche Membranwechselwirkungen gleichzeitig stattfinden (LUCY, 1970; MELIKYAN et al., 1983). Die Anordnungen der Lipiddoppelschichten der Membranen werden aufgehoben und, vorausgesetzt die Veränderungen sind reversibel, neu organisiert. Es entstehen Membranbrücken und Zytoplasmakanäle zwischen den Zellen, über die es zur Konfluenz der Zytoplasmen kommt. Irreversible Ver-

änderungen der Membranen führen zum Untergang der Zellen (BROCKMANN, 1985).

Zusammenfassend können nach POSTE und ALLISON (1973) vier Stadien der Membranfusion unterschieden werden:

1. Herstellung des notwendigen engen Membrankontaktes
2. Auslösung des Membranfusionsprozesses
3. Fusionsprozeß per se: Erstellung dauerhafter Verbindungen zwischen den Membranen
4. Stabilisierung: Wiederherstellung des 'Normalzustandes' der fusionierten Membranen

2.1.2 Fusionsmethoden

Zellfusionen können durch verschiedene Methoden ausgelöst werden. Nachfolgend werden die wichtigsten bekannten fusions-induzierenden Agenzien beschrieben.

2.1.2.1 Polyethylenglycol (PEG)

Polyethylenglycol ist wasserlöslich und hat die Strukturformel $\text{HO}(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n\text{H}$. Der pH-Wert ist abhängig vom Grad der Polymerisation. Die Fusionswirkung des PEGs ist abhängig vom Molekulargewicht und der Konzentration (DAVIDSON et al., 1976; KLEBE und MANUSCO, 1981; SPINDLE, 1981). Bei der Hybridisation von Säugetierzellen können nahezu 100% der Zellen fusioniert werden, wenn das PEG eine Konzentration von 50 % und das Molekulargewicht von 1000 aufweist. PEG mit extrem geringem (200) oder extrem hohem (20.000) Molekulargewicht zeigt dagegen nahezu keine fusionsinduzierende Wirkung. Saures oder basisches Medium kann die Wirkung des PEGs aufheben (KLEBE und MANUSCO, 1981). Durch Erhöhung der Temperatur von 10° C (keine Fusion) auf 35° C konnte die Fusionsrate von Pflanzenprotoplasten von 0 % auf 18 % gesteigert werden (WALLIN et al., 1974).

KAO und MICHAYLUK (1974) machten bei der PEG-induzierten Fusion von Pflanzenprotoplasten die Beobachtung, daß die Fusionsraten weitaus größer waren, wenn die zu fusionierenden Zellen zusätzlich mit einer mit Ca^{2+} -angereicherten Lösung behandelt wurden. Verlängerte PEG-Exposition der Protoplasten führte zu reduzierten Fusionsraten. So fusionierten 5,5 % der Protoplasten bei 45 Minuten dauernder Inkubation im Gegensatz zu 2,8 % bei 16-stündiger Inkubation. Verlängerte PEG-Exposition führte zu vermehrtem Absterben von pflanzlichen Zellen. MARAZ et al. (1978) gelang die Fusion gleich- oder verschiedengeschlechtig determinierter haploider Hefeprotoplasten (*Saccharomyces cerevisiae*) mit Hilfe von PEG, wobei die Fusionsprodukte sowohl diploid als auch polyploid waren. Nachdem WEBER et al. (1981a) Protoplasten diauxotropher Mutanten von *Saccharomyces lipolytica* und/oder *Lodderomyces elongisporus* mit Hilfe von Polyethylenglycol fusioniert hatten, erhielten sie prototrophe Hefekolonien. Auf diese Weise waren die auxotrophen Mängel der Protoplasten ausgeglichen worden.

Hybriden aus somatischen Zellen wurden durch die Fusion von Menschen- oder Mäusefibroblasten mit Lymphozyten durch Verwendung von PEG erstellt (PONTECORVO, 1975). Die höchste Fusionsrate (42 %) wurde jedoch bei der intraspezifischen Fusion von menschlichen Hautfibroblasten erzielt.

EGLITIS (1980) isolierte Blastomeren von Vierzellmäuseembryonen und fusionierte je zwei von ihnen mit Hilfe von PEG. Bei 56,8 % der Blastomerenpaare war die Fusion erfolgreich. Auf diese Weise entstanden tetraploide Fusionsprodukte, die anschließend wieder zu Vierer- oder Zweiergruppen aggregiert und kultiviert wurden. 72,9 % der Viereraggregate, 46,4 % der Zweieraggregate und 31,7 % der einzeln inkubierten tetraploiden Blastomeren teilten sich anschließend wieder. Die abnehmenden Teilungsraten bei Zweiergruppen oder einzelnen Blastomeren wurden weniger auf die geringe Zellzahl als vielmehr auf die Toxizität des Polyethylenglycols zurückgeführt. Tetraploide Mäuseembryonen konnten auch durch die PEG-vermittel-

Tabelle 1: Anwendungsgebiete und maximale Fusionsraten PEG-vermittelter Fusionen

Art der fusionierten Zellen	maximale Fusionsrate	Autoren
Hefeprotoplasten (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	keine Angabe	MARAZ et al. (1978)
Hefeprotoplasten (<i>Saccaromyces lipolytica</i> , <i>Lodderomyces elongisporus</i>)	keine Angabe	WEBER et al. (1981a)
verschiedene Pflanzenprotoplasten	um 10%	KAO und MICHAYLUK (1974)
Pflanzenprotoplasten (<i>Daucus carota</i>)	um 27%	WALLIN et al. (1974)
humane Hautfibroblasten	um 42%	PONTECORVO (1975)
Zellen aus Ratten- und Mäuselinien; humane Haut- fibroblasten	um 100%	DAVIDSON et al. (1976)
Mäuseblastomeren	56,8%	EGLITIS (1980)
Mäusezweizeller	82%	SPINDLE (1981)
Mäuseoozyten	81%	GULYAS et al. (1984)
Mäuse- und Schweineoozyten	keine Angaben	FULKA et al. (1985)

te Fusion von Zweizellembryonen innerhalb der Zona pellucida gewonnen werden (SPINDLE, 1981). Die hohe Fusionsausbeute (82 %) wurde durch die Zona pellucida bedingt, die die Tochterblastomeren in engem Kontakt hielt. Auf diese Weise war das Erstellen tetraploider Mäuseembryonen nicht an die Aggregation und Paarung von Blastomeren gebunden.

FULKA et al. (1985) wiesen mit PEG-Fusionen nach, daß die Kernreifung von reifen Mäuse- und Schweineoozyten nach ihrer Fusion mit heranreifenden Schweineoozyten gehemmt wird. Dagegen kann der Zweizellblock in der in vitro Kultur von MF1-Mäusehybridembryonen durch die Fusion einer MF1-Oozyte mit einer F₁-Oozyte überwunden werden (GULYAS et al., 1984). Die Fusionsprodukte teilten sich in vitro bis zur Blastozyste und implantierten nach Transfer in Empfängertiere. Wenn die Fusionspartner vor der Fusion mit Ethanol aktiviert wurden, fusionierten bis zu 81 % der MF1:CBA x C57BL-Oozyten.

Als Vorteile der PEG-Technik nannten SPINDLE (1981) die hohe Effektivität, das Fehlen toxischer Wirkungen und die Einfachheit dieser Methode. Die Nachteile der PEG-Fusionsmethode sind nach JACOB et al. (1984) die eventuell auftretenden Störungen in der Membranstruktur, die asynchronen Fusionsabläufe und die nicht geklärten Mechanismen der Fusion, welche die empirische Ermittlung von Fusionsparametern erfordern.

Von erheblich eingeschränktem Nutzen des PEGs für die Fusion von Seeigeloozyten berichteten RICHTER et al. (1981).

Die Anwendungsgebiete und maximale Fusionsraten von PEG-vermittelten Fusionen sind in Tabelle 1 dargestellt.

2.1.2.2 Inaktivierte Sendaiviren

Im Jahre 1957 machten OKADA et al. (1957) die Beobachtung, daß sich nach intraperitonealer Injektion von HVJ-Virus (Haemagglutinating virus of Japan) in Mäuse, in die zuvor Ehrlichs Tumorzellen implantiert worden waren, innerhalb einer Stunde riesige mehrkernige Tumorzellen gebildet hatten. Nach Virusadsorption agglutinierten die Tumorzellen, verschmolzen miteinander und bildeten somit große, mehrkernige Fusionsprodukte. Gleichzeitig wurde in verschiedenen anderen japanischen Arbeitsgruppen das HVJ-Virus, das auch Sendaivi-

rus genannt wird, isoliert (OKADA 1985). OKADA (1962) zeigte, daß die Fusion von Ehrlichs Tumorzellen mit Hilfe von Sendaiviren auch *in vitro* abläuft.

Die Sendaiviren werden den Parainfluenzaviren Typ I der Paramyxoviridae zugeordnet (RAO und JOHNSON, 1972). POSTE (1972) rechnet die Sendaiviren zu der Kategorie von Viren, deren Effekt als 'fusion from without' bezeichnet wird. Das heißt, daß keine intrazelluläre Virusreplikation und -synthese zur Zellfusion erforderlich ist.

Anfangs ging man davon aus, daß die Sendaiviren nicht direkt in den Membranfusionsprozeß zwischen den Zellen einbezogen werden (BÄCHI und HOWE, 1973). Heute herrscht die Meinung vor, daß durch Sendaiviren eine oder mehrere Zell-Virushülle-Zell-Brücken zwischen den Zellen entstehen, und daß es durch die Zellschwellungen, die für die durch Sendaiviren vermittelten Fusionen charakteristisch sind, zur Ausdehnung dieser Brücken und letztendlich zur Bildung einer fusionierten Zelle kommt (KNUTTON, 1980).

Sendaiviren für Zellfusionsexperimente werden in der Allantoishöhle von Hühnerembryonen gezüchtet (RAO und JOHNSON, 1972; GILES und RUDDLE, 1973). Um Wechselwirkungen zwischen Virusgenom und Zellgenom zu verhindern, werden sie vor der Anwendung inaktiviert. Dies geschieht entweder durch die Behandlung mit β -Propiolacton (BARANSKA und KOPROWSKI, 1970; GILES und RUDDLE, 1973) oder durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht (HARRIS und WATKINS, 1965; BROMHALL, 1975; LIN et al., 1973).

Die Fusionsausbeute bei Verwendung von inaktivierten Sendaiviren war abhängig vom pH-Wert des Fusionsmediums. Bei der Verschmelzung von Mäusezellen mit menschlichen Zellen wurde ein signifikant höherer Prozentsatz an Hybridzellen bei pH-Werten von 7,6 - 8,4 erzielt als bei pH-Werten von 6,8 - 7,2. 17 % Hybride als maximale Fusionsausbeute wurden bei pH 8,0

erreicht (CROCE et al., 1972). Weiterhin hing der Fusionserfolg von der Temperatur des Fusionsmediums ab. BÄCHI et al. (1973) beschrieben, daß bei Temperaturen unter 20° C keine Fusion zwischen menschlichen Erythrozyten stattfand, daß jedoch nach Erwärmung des Fusionsmediums auf 37° C bereits innerhalb von 30 Sekunden erste Anzeichen von Zellverschmelzungen zu erkennen waren. Auch die Viruskonzentration, die Zellzahl und die Empfänglichkeit der Zellen für die Sendaiviren beeinflussten den Fusionserfolg (HARRIS und WATKINS, 1965; POSTE und PASTERNAK, 1987). So beschrieben NEUMANN et al. (1980) das Fehlen von Rezeptoren für Sendaiviren bei *Dictyostelium discoideum*.

Nachteile der Sendaivirus-vermittelten Fusion sind die aufwendige Produktion, die unterschiedliche Aktivität verschiedener Chargen, der allmähliche Aktivitätsverlust bei Lagerung der Chargen und die Gefahr, Virusgenom in die behandelten Zellen einzubringen.

HARRIS und WATKINS (1965) erstellten Hybride aus Mäuse- und menschlichen Zellen. Sie benützten dazu sowohl aktive als auch inaktivierte Sendaiviren. Trotz Inaktivierung konnten sie eine Restaktivität der Sendaiviren nicht vollständig ausschließen. Die Ausbeute an polynukleären Heterokaryen war abhängig von der Konzentration und der Aktivität der Sendaiviren, wobei große Virusmengen und die Verwendung von aktiven Sendaiviren die Fusion der Zellkerne hemmten. Die Ursache scheint ein unspezifisch toxischer Effekt zu sein. Die RNA-Synthese der Heterokaryen entsprach der mononukleärer Zellen. Durch die Sendaivirus-vermittelte Fusion von Mäusemyelomzellen mit Milzzellen von Mäusen konnten Antikörper produzierende Zellkulturen erstellt werden (KÖHLER und MILSTEIN, 1975).

Um unbefruchtete Eizellen zu erhalten und sie zur Teilung anzuregen, fusionierten BARANSKA und KOPROWSKI (1970) mittels Sendaiviren Eizellen mit verschiedenen somatischen Zellen von Mäusen, Hamstern, Affen und Menschen mittels Sendaiviren. Da-

bei wurden Fusionsraten bis zu 60 % erzielt. Bis 60 % der Oozyten teilten sich nach der Fusion weiter, wobei einige das Morulastadium erreichten. Von den Oozyten, die nicht fusioniert wurden, teilten sich weniger als 6 %. Für diese Versuche war die Verdauung der Zona pellucida notwendig, um den Zell-Zell-Kontakt für die Fusion zu ermöglichen. LIN et al. (1973) modifizierten diese Methode in der Weise, daß sie somatische Zellen und eine Sendaivirussuspension in den perivitellinen Raum von parthenogenetischen Zwei- oder Achtzellern injizierten. Dabei fusionierten jedoch die Blastomeren untereinander häufiger als die somatischen Zellen mit den Blastomeren. Auf diese Weise entstanden Mosaikembryonen, deren Zusammensetzung letztendlich unklar war.

Durch die Fusion von Mäuseoozyten mit Hilfe von inaktivierten Sendaiviren wurden die Eizellen aktiviert und damit deren Teilung angeregt (SOUPART et al., 1979). Die Fusionsprodukte teilten sich bis zum Blastozystenstadium. Voraussetzung war ihre Verpackung nach der Fusion in leere Zonae pellucidae, die die dreidimensionale Anordnung der durch die Teilung entstehenden Blastomeren und damit deren Verbindung miteinander gewährleistete. Fusionsprodukte aus Oozyten, die aus Follikeln erhalten worden waren und Blastomeren des Zwei-, Vier- und 16-Zellstadiums von Mäusen teilen sich nach Sendaivirus-vermittelter Fusion nicht weiter (SZÖLLÖSI et al., 1980).

Bei Versuchen zum Vorkern- und Kerntransfer wurden inaktivierte Sendaiviren häufig eingesetzt. McGRATH und SOLTER (1983a; 1983b) fusionierten die durch Mikromanipulation erhaltenen Karyoplasten (bestehend aus Vorkernen, wenig Zytoplasma und umgebender Zellmembran) mit enukleierten Empfängerzellen, indem sie die Karyoplasten zusammen mit einer Sendaiviruslösung unter die Zona pellucida injizierten. 99 % fusionierten mit den enukleierten Eizellen. Bei gleichem Versuchsansatz konnten TSUNODA et al. (1986; 1987) 94 % der Karyoplasten mit den Empfängerzellen verschmelzen. Außer Vorkernen transplantierten MANN und LOVELL-BADGE (1984) mit die-

Tabelle 2: Anwendungsgebiete und maximale Fusionsraten Sen-
daivirus-vermittelter Fusionen

Art der fusionier- ten Zellen	maximale Fusionsraten	Autoren
somatische Zellen (Maus)/ somatische Zellen (Mensch)	keine Angabe	HARRIS und WAT- KINS (1965)
somatische Zellen (Maus)/ somatische Zellen (Mensch)	17 %	CROCE et al. (1972)
Myelomzellen/Milzzellen (Maus)	keine Angabe	KÖHLER und MIL- STEIN (1975)
Oozyten/somatische Zellen (Maus)/(Maus, Hamster, Affe, Mensch)	60 %	BARANSKA und KO- PROWSKI (1970)
2- und 8-Zellembryonen/ somatische Zellen (Maus)	keine Angabe	LIN et al. (1973)
Oozyten (Maus)	keine Angabe	SOUPART et al. (1979)
Oozyten/Blastomeren von 2-, 4- und 16-Zellem- bryonen (Maus)	keine Angabe	SZÖLLÖSI et al. (1980)
Karyoplasten/Einzellemby- onen (Maus)	99 %	McGRATH und SOLTER (1983a; 1983b)
Karyoplasten/Einzellemby- onen (Maus)	keine Angabe	MANN und LOVELL- BADGE (1984)
Karyoplasten/Einzellemby- onen (Maus)	94 %	TSUNODA et al. (1986; 1987)
Kerne von 2- und 8-Zell- embryonen/enukleierte Zweizellembryonen (Maus)	keine Angabe	ROBL und FIRST (1985)
Morulablastomeren/Oozyten (Kaninchen)	25,5 %	BROMHALL (1975)
Kerne von 8-Zellembryonen/ Oozyten (Kaninchen)	78 %	STICE et al. (1987)
Karyoplasten/enukleierte Einzellembyonen (Rind)	8 %	ROBL et al. (1987)

ser Methode auch Kerne von parthenogenetisch aktivierten Mäuseeizellen. Auch die Fusion von Kernen von Zwei- und Achtzellembryonen mit enukleierten Blastomeren von Zweizellembryonen der Maus wurde mittels inaktivierter Sendaiviren erreicht (ROBL und FIRST, 1985). Bei Kaninchenembryonen waren mit Sendaiviren ebenfalls Fusionen möglich. Maximal 25,5 % von isolierten Morulablastomeren (BROMHALL, 1975) und 78 % der Kerne von Achtzellembryonen fusionierten mit unbefruchteten Kanincheneizellen (STICE et al., 1987). Karyoplastenfusionen mit enukleierten Einzellembryonen von Rindern waren bei Verwendung von inaktivierten Sendaiviren zu 8 % erfolgreich (ROBL et al., 1987).

Die Anwendungsgebiete und maximale Fusionsraten Sendaivirus-vermittelter Fusionen sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Bezüglich weiterer Ausführung zu den oben angeführten Fusionsversuchen wird auf Kapitel 2.2 verwiesen.

2.1.2.3 Lysolecithin

Lysolecithin, ein Phospholipid, verursacht den Niederbruch von Lecithindoppelschichten und deren Umbildung in kugelförmige Mizellen (HAYDON und TAYLOR, 1963; AHKONG et al., 1975). Auf diese Weise kann Lysolecithin Membranfusionen auslösen. Außer mit Membranlipiden reagiert Lysolecithin vermutlich auch mit Membranproteinen (LUCY, 1970).

Lysolecithin ist in wässriger Lösung ohne Zusatz von bovinem Serumalbumin hochtoxisch für Zellen (KOPROWSKI und CROCE, 1973). Durch Zugabe von entfettetem Serumalbumin zu den fusionierten Zellen kann deren Lebensfähigkeit auf einige Stunden verlängert werden (POOLE et al., 1970). Trotz Zusatzes von bovinem Serumalbumin sind jedoch zellspezifische Unterschiede bezüglich der Lysolecithintoxizität vorhanden.

Erste erfolgreiche Fusionsversuche mit Lysolecithin beschrieben HOWELL und LUCY (1969). Nach Behandlung von Hühnererythrozyten mit Lysolecithin bildeten sich sehr schnell große Zellverbände, die bis zu 50 Kerne enthielten. Auch weiße Blutzellen waren mit den Erythrozyten fusioniert. Jedoch waren die Fusionsprodukte nur kurze Zeit lebensfähig. Heterokaryen aus Hühnererythrozyten erstellten POOLE et al. (1970), wobei maximal 20 % der Zellen miteinander fusionierten. Auch bei der Lysolecithin-vermittelten Fusion war die Fusionsrate von der Konzentration des Fusagens und der zu fusionierenden Zellen abhängig. Außerdem spielte, ähnlich wie bei PEG-vermittelten Fusionen, der pH-Wert des Mediums eine bedeutende Rolle. Für die Fusion von somatischen Zellen von Maus und Mensch erwiesen sich pH-Werte von 8,0 als optimal (CROCE et al., 1972).

Interessant ist ferner, daß durch die Fusion von Lysolecithin-behandelten Kaninchenspermien mit Hamsterzellen die DNA-Synthese im Kern der Spermien aktiviert werden kann, während dies durch die Sendaivirus-vermittelte Fusion nicht gelingt (SAWICKI und KOPROWSKI, 1971; KOPROWSKI und CROCE, 1973).

2.1.2.4 Weitere Fusionsmethoden

Neben Polyethylenglycol und Lysolecithin sind noch zahlreiche andere chemische Fusogene bekannt, die an dieser Stelle nur kurz genannt werden sollen, da ihre Anwendung wegen der geringen Fusionsausbeuten und der Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit der Zellen meist auf wenige Gebiete beschränkt blieb.

Dimethylsulfoxid und Polyole wie Glycerol, Sorbitol oder Mannitol wurden erfolgreich zur Fusion von Hühnererythrozyten eingesetzt (AHKONG et al., 1975; PILWAT et al., 1981). Auch mit Dextran höheren Molekulargewichtes konnten mehrkernige Zellen produziert werden. NAGATA (1978) fusionierte Pflanzen-

protoplasten mit Hilfe von Polyvinylalkohol, wobei das Fusionsmedium jedoch auch Mannitol und Calciumchlorid enthielt.

Membranen können durch unphysiologische Veränderungen ihrer unmittelbaren Umgebung, beispielsweise durch Einfrieren und anschließendes Auftauen (HUI et al., 1981), oder durch Zusatz von Calcium zu dem die Membranen umgebenden Medium fusioniert werden (KELLER und MELCHERS, 1973; PAPAHAJOPOULOS, 1978). Auch Phospholipidvesikel können die Fusion von Zellen auslösen (PAPAHAJOPOULOS et al., 1974).

2.1.3 Elektrofusion

2.1.3.1 Entwicklung

Im Jahre 1967 machten SALE und HAMILTON (1967) die Beobachtung, daß elektrische Pulse von ausreichender Stärke irreversible Membranveränderungen bei Mikroorganismen hervorriefen und damit deren Absterben verursachten. An Vesikelmembranen wurde später gezeigt, daß die durch elektrische Impulse hervorgerufenen Veränderungen auch vorübergehender Natur sein können und mit Permeabilitätserhöhungen einhergehen (NEUMANN und ROSENHECK, 1972). Dies wurde an Bakterienzellmembranen bestätigt (ZIMMERMANN et al., 1973). Dabei ist die Stärke der Feldpulse, die diese erhöhte Durchlässigkeit verursacht, auf einen sehr kleinen Pulsstärkenbereich beschränkt und ist abhängig von der Membranzusammensetzung und vom Einfluß des umgebenden Mediums. Die Steigerung der Permeabilität kann reversibel sein und ist experimentell steuerbar. Auch an Membranen von humanen und bovinen Erythrozyten wurden diese Beobachtungen gemacht. Das Phänomen der Permeabilitätserhöhung wurde als 'dielektrischer Durchbruch von Zellmembranen' bezeichnet (ZIMMERMANN et al., 1974a; ZIMMERMANN et al., 1974b).

SENDA et al. (1979) nutzten als erste den elektrisch induzierten Membrandurchbruch, um Pflanzenprotoplasten zu fusio-
nieren. Sie brachten die Spitzen zweier Mikroelektroden in
Kontakt mit zwei aneinanderhängenden Protoplasten und lösten
einen elektrischen Impuls aus. Nach wenigen Minuten war der
beginnende Fusionsprozeß zu erkennen, und innerhalb von 10
bis 30 Minuten hatte sich eine runde fusionierte Zelle gebil-
det, die mehrere Stunden überlebte. Somit war der erste mor-
phologische Beweis für eine erfolgreiche Elektrofusion
erbracht.

Ein Jahr später berichteten NEUMANN et al. (1980) von der
erfolgreichen Elektrofusion von Amöben (*Dictyostelium disco-
ideum*). Den für die Fusion notwendigen engen Kontakt der
Zellen erzielten sie durch Rollen der die Zellsuspension
enthaltenden Röhrchen.

ZIMMERMANN und SCHEURICH (1981) kombinierten erstmals die
Elektrofusion mit einem als 'Dielektrophorese' bezeichneten
Verfahren, das der Aneinanderlagerung von Zellen dient. Die-
ses Verfahren beruht auf der Tatsache, daß sich neutrale
Partikel und somit auch Zellen in einem ungleichförmigen
elektrischen Feld in Richtung der höchsten Feldstärke bewe-
gen, weil die Feldstärken an beiden Seiten des Partikels un-
gleich sind und daraus eine Nettokraft resultiert. Kommen in
einem ungleichförmigen elektrischen Feld mehrere neutrale
Partikel zusammen, so ziehen sie sich an und ordnen sich ent-
lang der Feldlinien perlenkettenartig an (MUTH, 1927; CRANE
und POHL, 1968; POHL, 1978; ZIMMERMANN, 1983).

Den ersten genetischen Beweis für die geglückte Elektrofusion
zweier Zellen lieferten WEBER et al. (1981a; 1981b). In Par-
allelversuchen zur PEG-vermittelten Fusion (siehe 2.1.2.1)
konnten sie durch Elektrofusion zweier PEG-vorbehandelter
diauxotropher Mutanten von Hefen die Ausbeute an prototrophen
Hefekolonien erheblich erhöhen. Ohne Zusatz von PEG zur Hefe-
protoplastenmischung vor den elektrischen Feldpulsen waren

jedoch keine Hybriden zu gewinnen. Dies wurde auf die fehlende enge Aneinanderlagerung der Protoplasten, die für Fusionen Grundvoraussetzung ist, zurückgeführt.

2.1.3.2 Mechanismus

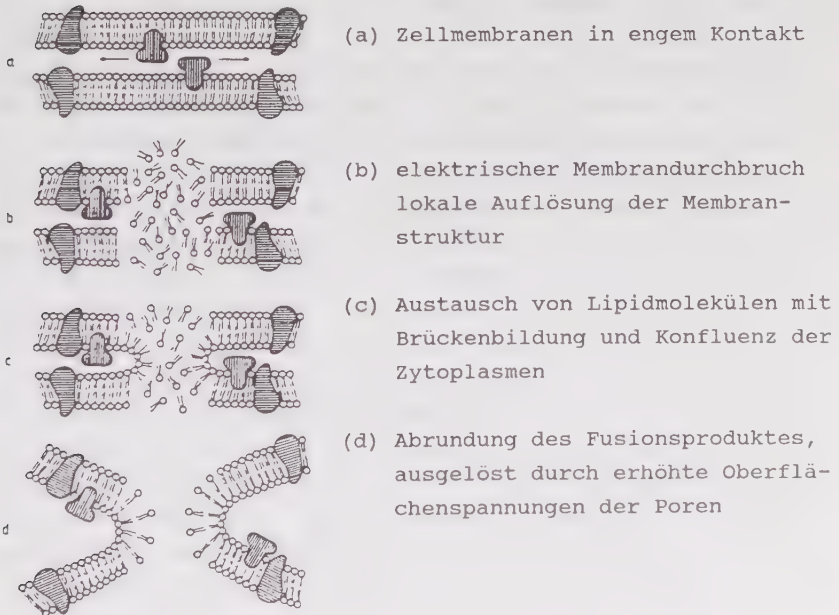
Im Moment des Auftreffens ausreichend starker elektrischer Pulse auf Zellmembranen wird deren Struktur aufgelöst. Dadurch können Stoffe zwischen dem Zellinnern und dem die Zellen umgebenden Medium ausgetauscht werden. Ist die Stärke der Fusionspulse zu groß oder ihre Dauer zu lang, kann die Membranstruktur der Zelle nicht wiederhergestellt werden. Ein irreversibler, mechanischer Membrandurchbruch führt unweigerlich zum Zelluntergang (BENZ et al., 1979; ZIMMERMANN und VIENKEN, 1982).

Durch elektrische Impulse hoher Intensität und kurzer Dauer kommt es jedoch nur zu einer kurzzeitigen Auflösung der Membranstruktur. Nach den Impulsen beginnt sofort ein Abdichtungsprozeß der Membrandefekte. Die Impulse führen also zu einem reversiblen elektrischen Membrandurchbruch. Durch den kurzzeitig ermöglichten Stoffaustausch können solche Impulse dazu benützt werden, zellfremde Stoffe in Zellen einzuschleusen. Dieses als Elektroporation oder Elektropermeabilisation bezeichnete Verfahren wird beispielsweise angewendet, um Pharmaka in Zellen einzuschleusen (ZIMMERMANN et al., 1980) oder um DNA in Bakterien (SHIVAROVA et al., 1983; BERG et al., 1984), in Hefezellen (HASHIMOTO et al., 1985), pflanzliche Zellen (FROMM et al., 1985; LANGRIDGE et al., 1985) und tierische Zellen zu transferieren (NEUMANN et al., 1982; WONG und NEUMANN, 1982; STOPPER et al., 1985).

Stehen im Augenblick der Pulsauslösung zwei eng aneinanderhaftende Zellen mit ihrer Kontaktfläche senkrecht zu den Feldlinien, so werden deren Membranen jeweils an den Zellpolen und in der Kontaktzone der Zellen durchbrochen (ZIMMER-

MANN et al., 1981). Die an diesen Punkten kurzzeitig entstehenden Poren ermöglichen den Austausch von Stoffen (ZIMMERMANN et al., 1981; ZIMMERMANN und VIENKEN, 1982). Kommt es zu Abdichtungsprozessen an den Membranen, können Lipidmoleküle zwischen beiden Zellmembranen ausgetauscht werden. Über die zwischen den aneinandergelagerten Zellen entstehenden Lipidbrücken kommt es zur Konfluenz der Zytoplasmen. Da der Krümmungsradius der Lipidbrücken sehr klein ist, sind die Oberflächenspannungen der Zellen erhöht. Dies bewirkt die Abkuglung des Fusionsproduktes (Abb. 1). Auf diese Weise entsteht eine fusionierte runde Zelle (ZIMMERMANN et al., 1981; PILWAT et al., 1981; ZIMMERMANN, 1982; MELIKYAN et al., 1983; ZIMMERMANN et al., 1984).

Abbildung 1: Modell für die molekularen Prozesse an den Zellmembranen bei der Elektrofusion (nach ZIMMERMANN und VIENKEN, 1982)



Die kritische Feldstärke E_C , bei der es zum Membranzusammenbruch kommt, kann für die Elektrofusion und Elektroporation berechnet werden (ZIMMERMANN, 1986):

$$V_C = 1,5 E_C \cdot a \cdot \cos \delta$$

Dabei steht V_C für die Durchbruchspannung, a für den Zellradius und δ ist der Winkel zwischen einem gegebenen Punkt auf der Zellmembran und der Feldrichtung. Die Zahl 1,5 stellt den Formfaktor für sphärische Zellen dar.

Über die Stärke des applizierten elektrischen Feldes kann die Anzahl und die Größe der entstehenden Poren bestimmt werden (ZIMMERMANN und VIENKEN, 1982; SUKHAREV et al., 1983). Gleichzeitig wird die Porengröße von der Dauer der Pulse beeinflusst. Längere Pulse bewirken die Ausbildung größerer Poren, für deren Abdichtung wiederum mehr Zeit benötigt wird (BENZ und ZIMMERMANN, 1981).

Die für den Durchbruch von Membranen erforderliche Pulslänge ist unmittelbar abhängig von der Durchbruchsspannung (ZIMMERMANN, 1982; MELIKYAN et al., 1983). Umgekehrt erfolgt der Membrandurchbruch in verschiedenen Spannungsbereichen, deren Größe von der jeweiligen Pulslänge abhängt (DIMITROV, 1984). Die Durchbruchspannung liegt bei Zellen im Bereich von einigen kV/cm. Sie ist nicht vom pH-Wert des umgebenden Mediums, wohl aber von dessen Temperatur abhängig. Mit höheren Temperaturen nimmt die Durchbruchspannung ab (BENZ et al., 1979).

Die Abdichtung der Membranstrukturen und damit auch die Persistenz der entstehenden Poren ist temperaturabhängig (BENZ und ZIMMERMANN, 1981). An Lipiddoppelmembranen konnte gezeigt werden, daß die Abdichtungsvorgänge, die bei 2°C 20 µs dauern, bei Temperaturen von 20°C innerhalb von 2 µs abgeschlossen sind.

2.1.3.3. Technik

Für die Elektrofusion ist genauso wie bei anderen Fusionsmethoden die enge Aneinanderlagerung der Zellen Grundvoraussetzung. Der Zellkontakt kann auf unterschiedliche Weise erreicht werden:

- mechanisch mit Hilfe von Mikromanipulatoren (SENDA et al., 1979)
- durch Rollen der Zellen in Plastikröhrchen (NEUMANN et al., 1980),
- chemisch mit Hilfe zum Beispiel von Phytohaemagglutinin (TSUNODA et al., 1987)
- physikalisch mit Hilfe elektromagnetischer Felder oder Ultraschallwellen (ZIMMERMANN, 1986).

Meist wird jedoch für die Zellaggregation zur Elektrofusion von der Dielektrophorese Gebrauch gemacht. Da Gleichstrom zur Erzeugung eines ungleichförmigen elektrischen Feldes bei den Zellen zu Membrandurchbrüchen führen könnte, wird Wechselstrom verwendet. Zur Erzeugung eines Wechselfeldes wird ein Funktionsgenerator benötigt. Die Verwendung von Wechselstrom beeinträchtigt die Aufreihung der Zellen entlang der elektrischen Feldlinien nicht, da die Richtung ihrer Bewegung immer zur höchsten Feldstärke orientiert bleibt (ZIMMERMANN, 1983). Die Aufreihung und damit Aggregation der Zellen erfolgt innerhalb weniger Sekunden. Ihre Aneinanderlagerung ist optimal, sobald ihre Membranen in der Kontaktzone abgeflacht sind (ZIMMERMANN und VIENKEN, 1982).

Durch Anlegen von Wechselstrom wandern Ionen des Fusionsmediums hin und her, je nach Position des Plus- und Minuspols. Sind im Medium viele Ionen vorhanden, führt dies durch Reibung zur Erhitzung des Mediums. Auf diese Weise entstehen Turbulenzen, die wiederum die perlenkettenartige Anordnung der Zellen entlang der Feldlinien stören und damit den Fusionsprozeß negativ beeinflussen. Bei der Anwendung der Dielektrophorese ist somit die Verwendung eines Mediums mit möglichst geringer Ionendichte und damit geringer Leitfähig-

keit von unter $10^{-4} \Omega \text{ cm}^{-1}$ notwendig (ZIMMERMANN und VIENKEN, 1982). Um jedoch die erforderliche Osmolarität zu gewährleisten, sind Lösungen für die Fusion von Zellen meist mit Nichtelektrolyten versetzt (ZIMMERMANN et al., 1981). Verwendung finden 0,3 M bis 0,5 M Mannitlösungen (PILWAT et al., 1981; KUBIAK und TARKOWSKI, 1985), 0,3 M bis 1,2 M Glucoselösungen (OZIL und MODLINSKI, 1986; RICHTER et al., 1981), 1,2 M Sorbitlösungen (FÖRSTER und EMEIS, 1985) oder im Handel erhältliche Fusionsmedien (ROBL et al., 1987). An Heffeprotoplasten konnte gezeigt werden, daß durch Zugabe geringer Mengen an Calcium- und Magnesiumionen sowie Albumin die Fusionsausbeute erheblich vergrößert werden kann (SCHNETTLER und ZIMMERMANN, 1985). Dieser Effekt wird auf erhöhte Membranstabilität zurückgeführt.

Wird vor der Elektrofusion kein Wechselfeld angelegt, so können für die Elektrofusion konventionelle Medien verwendet werden, da sich die Pulsdauern im Mikrosekundenbereich bewegen und es in diesen kurzen Zeitspannen zu keiner nennenswerten Erwärmung des Mediums kommt (KUBIAK und TARKOWSKI, 1985; TSUNODA et al., 1987). Zur Erzeugung von Gleichstrompulsen dient ein Pulsgenerator, der mit den Elektroden der Fusionskammer verbunden wird. Der Pulsgenerator kann allein mit den Elektroden verbunden sein, wenn keine Dielektrophorese ausgelöst werden soll (OZIL und MODLINSKI, 1986) oder mit einem Funktionsgenerator parallel geschaltet werden, um Dielektrophorese und Elektrofusion mit einem Aufbau zu ermöglichen (PILWAT et al., 1981). Auch finden Geräte mit kombiniertem Frequenz- und Pulsgenerator Anwendung (FÖRSTER und EMEIS, 1985).

Die Elektroden für die Zellfusion durch elektrische Pulse sind aus rostfreiem Stahl (BERG, 1982; TEISSIE et al., 1982), Gold (RICHTER et al., 1981; ZIMMERMANN und SCHEURICH, 1981) oder Platin (NEUMANN et al., 1980; BERG, 1982). Die Elektroden sind meist draht- oder bandförmig. TEISSIE et al. (1982) benutzten einfache Rasierklingen als Elektroden. Der Abstand

der Elektroden muß die Größe der zu fusionierenden Zellen berücksichtigen und schwankt um Bereiche von 30 μm für die Fusion von Hefeprotoplasten (FÖRSTER und EMEIS, 1985) bis zum Abstand von 1,4 cm für die Fusion von Amöben (NEUMANN et al., 1980). Beide Elektroden können flexibel und mit Hilfe von Mikromanipulatoren verschieblich sein (SENDA et al., 1979; BERG, 1982), oder eine Elektrode ist fixiert, die andere flexibel (ZIMMERMANN et al., 1984). Die Fixation der Elektroden wird durch Aufkleben (KUBIAK und TARKOWSKI, 1985), Aufspritzen (RICHTER et al., 1981) oder Aufdampfen (FÖRSTER und EMEIS, 1985) auf Glas- oder Plastikuntergrund erreicht. Wegen der einfacheren Handhabung werden meist beide Elektroden parallel zueinander fixiert. Dies ermöglicht die gleichzeitige Fusion mehrerer Zellpaare oder Zellgruppen.

Auch bei scheinbar paralleler Anordnung der Elektroden ist ein ausreichend ungleichförmiges elektrisches Feld für die Dielektrophorese von Zellen vorhanden, deren Durchmesser größer als 4 μm ist (ZIMMERMANN, 1983). Um große Zellmengen gleichzeitig fusionieren zu können, wurden Helix- und Mäanderkammer entwickelt. Die Helixkammer besteht aus zwei parallel und schraubenartig gewundenen Elektroden, die in eine Zellsuspension getaucht werden können (ZIMMERMANN, 1983). Bei der Mäanderkammer ragen die Elektroden kammförmig ineinander und sind auf einen Objektträger aufgedampft. Auf diese Weise befindet sich zu beiden Seiten jeder Elektrode eine Gegenelektrode, was die Fusionsfläche erheblich vergrößert (ZIMMERMANN und VIENKEN, 1982). Um Zellhybriden verschiedener Spezies erstellen zu können, entwickelten ZIMMERMANN und VIENKEN (1982) eine Durchflußkammer, mit der die Zusammensetzung der Zellaggregate über die Befüllung der Kammer während der Dielektrophorese gesteuert werden kann. Für die leichtere Gewinnung der fusionierten Zellen wurde eine Rotationsfusionskammer entwickelt, in der fusionierte Zellen abzentrifugiert werden können (ZIMMERMANN, 1986).

Steriles Arbeiten ist durch Abdecken der Fusionskammern mit Deckgläschen (JACOB et al., 1984) oder steriler Vaseline (VIENKEN et al., 1983) möglich.

2.1.3.4 Anwendung

2.1.3.4.1 Lipidmembranen und Liposomen

Künstlich erstellte Lipiddoppelschichten können wie Zellmembranen mit Hilfe elektrischer Pulse durchbrochen werden (BENZ et al., 1979; BENZ und ZIMMERMANN, 1981). Damit steht für die Erforschung der exakten Vorgänge an Membranen im Moment der Pulsauslösung ein ideales Modell zur Verfügung. MELIKYAN et al. (1983) brachten zwei Lipiddoppelmembranen durch hydrostatischen Druck in Berührung. Durch elektrische Pulse wurde die Fusion der beiden Schichten ausgelöst und es bildete sich eine zylindrische Membran.

Von der erfolgreichen Fusion von Liposomen mit einem Durchmesser von ca. 10 μm berichteten ZIMMERMANN et al. (1981). BÜSCHL et al. (1982) verschmolzen dagegen Liposomen, die etwa die Größe von Zellen hatten, um Vorversuche für eine später beabsichtigte Zell-Liposomen-Fusion zu machen.

2.1.3.4.2 Bakterien und Hefen

RUTHE und ADLER (1985) berichteten als erste von der Elektrofusion von Bakterienspheroplasten. Sie verwendeten Zellen von *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium*. Bei interspezifischer Fusion entstanden Spheroplasten, die die genetischen Marker beider Stämme in sich vereint hatten. Voraussetzung für die erfolgreiche enge Aneinanderlagerung der Zellen während der Dielektrophorese und damit auch für die Fusion war jedoch, daß sie aus langen, filamentösen Formen hervorgingen und unter Anwesenheit von Cephalixin zu großen, ungeteilten

Spheroplasten gewachsen sein mußten. Zusätzlich mußten sie mit Tris/EDTA/Lysozym vorbehandelt werden. Über 90 % der Zellen fusionierten unter Verwendung von fünf Pulsen und einer Feldstärke von 4 kV/cm.

SHIVAROVA et al. (1983a) fusionierten Protoplasten von *Bacillus thuringiensis*. Für die Zellaggregation verwendeten sie Polyethylenglycol, das alleine appliziert keine fusions-induzierende Wirkung zeigte. Die angewendete Feldstärke von 20 kV/cm war ausgesprochen hoch, führte aber nicht zur Zell-lysis. Feldstärken von 14 kV/cm zeigten keine fusionierende Wirkungen. Durch Fusion von Zellen eines Kanamycin-resisten-ten Stammes mit Protoplasten eines Kanamycin-empfindlichen Stammes, die gleichzeitig ein Pigment produzierten, entstanden Kanamycin-resistente, Pigment produzierende Zellen (SHI-VAROVA et al., 1983b).

Wie bereits im Kapitel 2.1.3.1 beschrieben, konnten WEBER et al. (1981a) als erste beweisen, daß durch die Fusion von Hefeprotoplasten deren diauxotrophe Mängel ausgeglichen wurden und somit auch genetisch deren Verschmelzung nachweisbar war. Protoplasten der Stämme *Saccharomycopsis lipolytica* und *Lodderomyces elongisporus* wurden mit Polyethylenglycol vorbe-handelt und sowohl intraspezifisch als auch interspezifisch mit Hilfe elektrischer Impulse fusioniert. Die Fusionsausbeute erhöhte sich bei der intraspezifischen Fusion von *Saccha-romycopsis lipolytica* um das 20- bis 30-fache, bei der inter-spezifischen Fusion beider Stämme um das 80-fache gegenüber den nur mit Polyethylenglycol vorbehandelten Protoplasten. Als Fusionsmedium wurde 1,4 M Sorbitlösung mit dem Zusatz von 0,01 M CaCl_2 verwendet. Waren bei der intraspezifischen Fu-sion Feldstärken von 3 bis 5 kV/cm ausreichend, so erforderte die interspezifische Fusion der Protoplasten Feldstärken von 10 kV/cm. Jeweils ein Puls mit der Dauer von 40 μs wurde appliziert. Für die Fusion von Protoplasten des Stammes *Saccharomyces cerevisiae* war die Feldstärke von 2,5 kV/cm aus-reichend. Gegenüber ausschließlich mit Polyethylenglycol vor-

behandelten Zellen konnten mit Hilfe der Elektrofusion die Ausbeuten an Hybridzellen auf mehr als das 200-fache gesteigert werden (WEBER et al., 1981b).

Die Fusion zweier verschiedener Stämme von *Saccharomyces cerevisiae*, von denen einer eine Defektmutante bezüglich der Zellatmung darstellte, zeigte, daß zwar die Zellplasmen verschmolzen waren, die Kerne dagegen nicht fusioniert waren (HALFMANN et al., 1982). Es handelte sich um den diploiden Stamm 3441, der zellatmungsfähig ist und chromosomale Marker enthält, und den diploiden Stamm 2114, der zur Zellatmung nicht befähigt ist. Nach Dielektrophorese (1 kV/cm, 2 MHz) führten zwei Pulse im Abstand von 10 s und einer Pulsdauer von 40 µs zum Fusionserfolg, wenn Feldstärken von 7 bis 8 kV/cm verwendet wurden. Die Isolation auf Selektionsmedium erbrachte diploide, zur Zellatmung befähigte Hybriden, die die chromosomalen Marker des Stammes 2114 und die Zytoplasmamarker des Stammes 3441 aufwiesen. Durch Transfer von Mitochondrien war durch die Elektrofusion der Zytoplasmadefekt beseitigt worden.

In weiteren Versuchen an *Saccharomyces cerevisiae* zeigte sich, daß durch Elektrofusion erstellte Hybriden aus dem Stamm 93, einer polyploiden zellatmungsnegativen Mutante und aus dem Stamm 111a, einem haploiden zellatmungsaktiven Stamm, bezüglich ihrer Chromosomen nicht stabil waren. Nach Übertragung der Hybriden auf Vollnährmedium waren zunächst Heterokaryen nachzuweisen, aus denen sich spontan Elterntyp-Zellen absonderten. Über mehrere Passagen auf Selektionsmedium konnten stabile Hybriden isoliert werden. Diese zeigten jedoch teilweise oder komplette Rekombination ihrer Chromosomen (HALFMANN et al., 1983).

Die Auswirkungen unterschiedlicher Dielektrophoresebedingungen auf die Lebensfähigkeit der Hefestämme *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces diastaticus* untersuchten FÖRSTER und EMEIS (1985). Sofern die Dielektrophoresespannung die für

den elektrischen Durchbruch benötigte Spannung nicht überstieg, zeigte sich kein signifikanter Einfluß der Dielektrophoreseparameter auf die Lebensfähigkeit der Zellen. Dabei konnte die Dielektrophoresespannung von 0,33 bis 6,67 kV/cm und die Frequenz des Wechselfeldes von 1 bis 2 MHz variiert werden. Die Feldstärke von 1 kV/cm und die Frequenz von 1 MHz schienen optimale Fusionsbedingungen zu schaffen. Für die Elektrofusion der Protoplasten erwiesen sich vier Pulse mit der Dauer von 30 μ s und der Feldstärke von 15 kV/cm als wirksam. Dabei betrug der Abstand zwischen dem ersten und zweiten sowie dem dritten und vierten Puls jeweils 10 Sekunden. Zwischen dem zweiten und dritten Puls lagen 60 Sekunden. Die Fusionsrate der Hefeprotoplasten wurde mit $4,8 \cdot 10^{-4}$ berechnet. Pro Kammerfüllung (Mäanderkammer) entstanden auf Selektionsmedium durchschnittlich 272 Kolonien.

Wie bereits beschrieben, kann die Ausbeute an fusionierten Protoplasten von *Saccharomyces cerevisiae* durch die Zusammensetzung des Fusionsmediums erheblich beeinflusst werden (SCHNETTLER und ZIMMERMANN, 1985). Durch Zusatz von 0,1 mM Calciumacetat und 0,5 mM Magnesiumacetat zu einer 1,2 M Sorbitlösung werden statt 40 bis 120 Hybriden 1000 bis 2000 Hybriden pro Füllung der Helikalkammer produziert. Wird dem Fusionsmedium darüberhinaus noch 1 mg/ml Albumin zugesetzt, so entstehen bis zu 4000 Hybridzellen. Den zweiwertigen Kationen wird ein membranstabilisierender Effekt zugesprochen, während der Effekt des Albumins ungeklärt bleibt. Vermutlich ändert Albumin die elektrischen Eigenschaften der Zellmembranen.

Anwendungsgebiete, Fusionsparameter und Fusionsraten der in der Literatur beschriebenen Elektrofusionsversuche bei Bakterien und Hefen sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

TAB. 3: Elektrofusion von Bakterien und Hefen: Anwendungsgebiete, Fusionsparameter und Fusionsraten

Art der fusionierten Zellen	Fusionsmedium	Art der Zellaggregation	Pulsanzahl	Pulsdauer (us)	Pulsabstände (s)	Pulsstärke (kV/cm)	Maximale Fusionsrate	Autoren
Bakterienspheroplasten (<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella typhimurium</i>)	0,8 M Sucroseisg. + 1 mM $MgCl_2$	Dielektrophorese 1 kV/cm, 1 MHz	6	15	5	4	94%	RUTHE und ADLER, 1985
Bakterienprotoplasten (<i>Bacillus thuringiensis</i>)	SWMP + 40% PEG	PEG	3	5	3	20	10^3 Rekombinationen	SHIVAROVA et al., 1983
Hefeprotoplasten (<i>Saccharomyces lipolytica</i> und/oder <i>Lodderomyces elongisporus</i>)	1,4 M Sorbitisg. + 0,01 M $CaCl_2$ + 40% PEG	PEG	1	40	-	3-5 intra-spezif., 10 inter-spezif.	20-35 fach gegenüber PEG 80 fach gegenüber PEG	WEBER et al., 1981 a
Hefeprotoplasten (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	1,4 M Sorbitisg. + 0,01 M $CaCl_2$ + 40% PEG	PEG	1	40	-	2,5	233 fach gegenüber PEG	WEBER et al., 1981 b
Hefeprotoplasten (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Stamme 2114, 3441)	1,2 M Sorbitisg. + 1 mM $CaCl_2$	Dielektrophorese 1 kV/cm, 2 MHz	2	40	10	7-8	$1-2 \times 10^4$ ggl./ 10^4 bei anderen Fusionstechniken	HALFMANN et al., 1982
Hefeprotoplasten (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , Stamme 93,111a)	1,2 M Sorbitisg. + 1 mM $CaCl_2$	Dielektrophorese 1 kV/cm, 2 MHz	2	40	10	8	keine Angabe	HALFMANN et al., 1983
Hefeprotoplasten (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Saccharomyces diastaticus</i>)	1,2 M Sorbitisg.	Dielektrophorese 1 kV/cm, 1 MHz	4	30	10-60-10	15	$4,8 \times 10^{-4}$	FÜRSTER und FNEIS, 1985
Hefeprotoplasten (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	1,2 M Sorbitisg. + 0,1 mM Ca-Acetat + 0,5 mM Mg-Acetat + 1 mg/ml Albumin	Dielektrophorese 0,25-0,3 kV/cm 2 MHz	2	10	0,5	10	4000 Hybride/Experiment ggl., 40 -120 Hybride bei reiner Sorbitisg.	SCHNETTLER und ZIMMERHANN, 1985

2.1.3.4.3 Pflanzen

Nachdem SENDA et al. (1979) die ersten erfolgreichen Elektrofusionsversuche an Pflanzenprotoplasten unternommen hatten, folgten zahlreiche Berichte über die Anwendung der Dielektrophorese und Elektrofusion. Pflanzliche Zellen eignen sich wegen ihrer Membraneigenschaften sehr gut für die Elektrofusion. Die Dielektrophoresefrequenz kann von 20 kHz bis zu 2 MHz variiert werden und die Durchbruchspannung ist - je nach Zellgröße - bei 0,5 bis 5,0 kV/cm erreicht (ZIMMERMANN, 1986). Bei fusionierten Pflanzenprotoplasten konnte nachgewiesen werden, daß sich die 'hydraulische Leitfähigkeit' der Fusionsprodukte nicht von der nicht fusionierter Zellen unterschied (SALHANI et al., 1982).

War bei den anfänglich durchgeführten Experimenten nur dem Fusionserfolg Aufmerksamkeit geschenkt worden (SENDA et al., 1979; ZIMMERMANN und SCHEURICH, 1981; KOOP et al., 1983; JACOB et al., 1984), galt das Hauptinteresse später den Überlebens- und Regenerationsraten der Fusionsprodukte. Über eine Regeneration von 62 % der Fusionsprodukte aus Tabakprotoplasten zu Mikrokalli berichtete KOOP (1984). Erste Schößlinge aus dem Kallus fusionierter Protoplasten erhielt man ein Jahr später (BATES, 1985; KOHN et al., 1985; TEMPELAAR und JONES, 1985a; TEMPELAAR und JONES, 1985b).

2.1.3.4.4 Hybridomazellen

Nachdem KÖHLER und MILSTEIN (1975) gezeigt hatten, daß durch die Sendaivirus-vermittelte Fusion von Myelomzellen mit Milzzellen Antikörper-produzierende Hybridzellen (Hybridomazellen) entstehen, setzten nach Manifestation der Elektrofusion bald Bestrebungen ein, Hybridomazellen auch mit dieser neuen Technik zu erstellen.

Es wurden entweder einzelne Zellpaare (BERG et al., 1983) oder viele Zellpaare in einem Versuchsdurchgang gleichzeitig fusioniert. BISCHOFF et al. (1982) verschmolzen erstmals menschliche B-Lymphozyten und Myelomzellen durch elektrische Pulse. Nach Dielektrophorese (0,1 kV/cm, 2 MHz) führten zwei Pulse mit der Dauer von je 7 μ s und der Stärke von 3,5 kV/cm zur Verschmelzung beider Zellarten. Bei diesen Werten wird verhindert, daß die Lymphozyten untereinander fusionieren. Durch Herstellung eines 5:1-Verhältnisses zwischen Lymphozyten und Myelomzellen konnten Fusionen von Myelomzellen untereinander fast völlig ausgeschlossen werden und es resultierten hohe Ausbeuten an Hybridomazellen.

Durch hydraulische Beschickung der Fusionskammer während der Dielektrophorese steuerten ZIMMERMANN und VIENKEN (1982) die Aggregation von Mäusemyelomzellen und Mäuselymphozyten. 60-80 % aller Zellen zeigten auf diese Weise die gewünschte Paarung. Bei einem Feldpuls mit der Stärke von 4 kV/cm und der Dauer von 20 μ s fusionierten die Aggregate, vorausgesetzt, daß die Zellen mit Dispase oder Pronase vorbehandelt worden waren, um sie gegen die hohen Feldstärken zu schützen und so die Elektrofusion zu erleichtern. Dieses Phänomen beruht auf der proteolytischen Aktivität der Proteasen (OHNO-SHOSAKU und OKADA, 1984). Die Verwendung von Proteasen wiederum kann aber die Lebensfähigkeit der Zellen negativ beeinflussen. Während der Permeabilitätserhöhung der Membranen durch die elektrischen Pulse können diese Enzyme in das Zellinnere gelangen und zu Schädigungen führen. Um dieses zu verhindern, behandelten VIENKEN et al. (1983) nicht die Zellen, sondern den Boden der Fusionskammer mit Pronase vor, was den Fusionserfolg nicht beeinträchtigte.

LO et al. (1984) erhielten erstmals antikörperproduzierende Fusionsprodukte mit Hilfe der Elektrofusion. Um die Zellen zu aggregieren, machten sie sich folgende Technik zunutze: an die Antikörper-tragenden B-Lymphozyten wurden das spezifische Antigen und Avidin gebunden (B-Zell-Antigen-Avidin-Komplex).

Gleichzeitig wurde Biotin an die Oberfläche der Myelomzellen gebunden. Bei Inkubation der B-Lymphozyten mit den Myelomzellen bildeten sich kovalente Bindungen zwischen dem B-Zell-Antigen-Avidin-Komplex und dem Biotin der Myelomzellen aus. Durch vier Pulse mit der Stärke von 4 kV/cm und der Dauer von je 5 μ s wurde die Fusion dieser Aggregate ausgelöst. Über Selektionsmedium konnten die Hybridzellen anschließend isoliert und auf ihre Antikörperproduktion überprüft werden.

2.1.3.4.5 Oozyten, Blastomeren und Kerne

- Oozyten

Von der Fusion von Oozyten des Seeigels *Paracentrotus lividus* berichteten RICHTER et al. (1981). Nach Entfernung der die Eizellen umgebenden Gallerte und der Eihüllen war es möglich, die Oozyten in einem inhomogenen elektrischen Feld (0,1-0,22 kV/cm, 2 MHz) in engen Membrankontakt zu bringen. Mit zwei Pulsen der Stärke 0,4 kV/cm und der Dauer von 50-400 μ s im Abstand von 3 Minuten wurde die Fusion ausgelöst. Meist waren die Fusionsprozesse bereits nach dem ersten Puls zu erkennen. Bis zu 60 % der Eizellen konnten auf diese Weise fusioniert werden, was an ihrer Zellgröße und zwei oder mehr Kernen im Fusionsprodukt erkennbar war. Die Fusion von Zweizellstadien innerhalb ihrer Eihüllen gelang mit Hilfe derselben Technik. Die Befruchtungsfähigkeit der Eizellen blieb erhalten, wenn mehr als zwei Oozyten miteinander fusionierten, wobei jedoch nur ungleichmäßige Teilungsformen entstanden. Nach der Teilung degenerierten die Eizellen.

- Blastomeren

Die Blastomeren von 2-, 4- und 8-Zellstadien von Mäuseembryonen sowie von Blastozysten von Mäusen fusionierte BERG (1982) im elektrischen Feld. Dabei wurde jeweils die Anzahl der Blastomeren um die Hälfte reduziert. Als Fusionsmedium

verwendete er DBS mit dem Zusatz von 20 % FKS. Verwendet wurden Elektroden verschiedener Gestalt, die jeweils mit Hilfe eines Mikromanipulators fixiert worden waren. Da die Blastomeren der Embryonen bereits in engem Kontakt standen, wurde kein Wechselstromfeld angelegt. Ein Puls mit der Stärke von 1 bis 4 kV/cm und der Dauer von 1000 bis 5000 μ s wurde ausgelöst. Für die Fusion von Blastomeren innerhalb einer Blastozyste wurden 2 Pulse mit der Stärke von 2 kV/cm und der Dauer von je 5000 μ s verwendet. Zweizeller fusionierten zu einer Zelle, Vierzeller zu zwei und Achtzeller zu vier Zellen oder zu einer Zelle. Es waren damit polyploide Zellen entstanden. Die Organisation der Blastozysten wurde durch die Fusion ihrer Blastomeren zerstört und die Zelldifferenzierung verschwand.

Über die Fusion von Zweizellern von Mäusen innerhalb der Zona pellucida berichteten CLEMENT et al. (1988). Maximale Fusionsraten wurden mit der Kombination aus vier Fusionspulsen, der Pulsdauer von 70 μ s und der Feldspannung von 0,53-0,94 kV/cm erzielt. Mit diesen Fusionsparametern fusionierten 37 von 41 Zweizellern (90 %). In der in vitro Kultur teilten sich 42 % der fusionierten Zweizeller. Von den geteilten fusionierten Zweizellern entwickelten sich 10 % bis zum Morula- und Blastozystenstadium. Nach in vivo Kultur von fusionierten Zweizellern über zwei bis vier Tage hatten sich 26 % der wiedergefundenen Embryonen zu Blastozysten entwickelt. Nach Transfers von 163 fusionierten Zweizellern und 104 Kontroll-embryonen in Empfängertiere wurden 21 Kontrolltiere, aber kein Tier aus der Fusion geboren.

Bei der Fusion von Blastomeren von zwei oder mehr Embryonen, was die Auflösung der Zona pellucida mittels Pronase voraussetzt, ergab sich, daß Embryonen ohne Zona pellucida im elektrischen Feld schneller lysieren. In weiteren Versuchen (BERG, 1983) an 2-, 4- und 8-Zellern von Mäusen zeigte sich, daß die Fusion von Blastomeren ohne die sie umgebende Zona pellucida bei Feldstärken von 5 kV/cm und einer Pulsdauer von

100 μ s ablief, während für die Fusion innerhalb der Zona größere Feldstärken bei gleicher Pulsdauer benötigt wurden. Nach Transfer implantierten fusionierte Zweizeller und entwickelten sich noch bis zum elften Tag der Gravidität weiter.

KUBIAK und TARKOWSKI (1985) fusionierten die Blastomeren von Zweizellembrionen der Maus innerhalb der Zona pellucida. Als Fusionsmedium verwendeten sie entweder als elektrolytfreies Medium 0,3 M Mannitlösung oder als elektrolythaltiges Medium PBS. Bei Auslösung von zwei Pulsen mit der Stärke von 1 kV/cm konnten in elektrolytfreier Lösung Pulse bis zur Dauer von 1000 μ s angewendet werden, ohne daß die Embryonen dadurch geschädigt wurden. Alle 15 Embryonen, die dieser Behandlung unterzogen wurden, fusionierten (Tab. 4). In PBS führten unter gleichen Bedingungen Pulse von 1000 μ s Dauer zur Zelllysis. Pulse von 250 μ s fusionierten dagegen 64 von 65 Zweizellembrionen (98,5 %). Pulse von nur 20 μ s führten in beiden Medien bereits zur Fusion einiger Embryonen (20 % in Mannitlösung und 5 % in PBS). Bei Verwendung von zwei Pulsen von je 50 μ s und Variation der Feldstärke fusionierte in PBS keiner von 35 Embryonen, dagegen fusionierten 35 % der Embryonen bei der Feldstärke von 0,8 kV/cm und 100 % bei 1 kV/cm. In der Regel waren die Fusionsprozesse nach 20 bis 30 Minuten abgeschlossen.

TAB. 4: Fusionsergebnisse bei Zweizellembrionen der Maus nach KUBIAK und TARKOWSKI (1985)

Pulsdauer (μ s)		0,3 M Mannitlösung fus./ges. %		PBS fus./ges. %	
2 x	20	15/75	20	2/40	5
2 x	50	41/67	61	66/98	67
2 x	100	45/79	57	37/48	77
2 x	250	66/75	88	64/65	98,5
2 x	1000	15/15	100	-	-

Bei Auslösung der Pulse spielte die Ausrichtung der Embryonen im elektrischen Feld eine wichtige Rolle. War die Kontaktfläche der beiden Blastomeren nicht senkrecht, sondern parallel oder im Winkel von 45° zu den Feldlinien angeordnet, so fusionierte keiner von 69 Embryonen (KUBIAK und TARKOWSKI, 1985).

Die Weiterentwicklung der fusionierten Zweizeller entsprach der von tetraploiden Embryonen: im 4- bis 8-Zellstadium begann bereits ihre Kompaktierung, und bei Blastozysten war die Zellzahl gegenüber unbehandelten Embryonen auf etwa die Hälfte reduziert. Nach Transfer implantierten sie, jedoch degenerierten alle Feten vor dem Geburtstermin.

Durch Übertragung von Embryonen, die zwar mit elektrischen Pulsen behandelt wurden, jedoch nicht fusioniert waren, konnte gezeigt werden, daß diese Behandlung die Embryonen nicht schädigt. Aus diesen Transfers gingen lebende, gesunde Jungtiere hervor. Neben Zweizellembryonen wurden auch 3- und 4-Zellembryonen der Elektrofusion unterzogen. Dabei waren für die Fusion von mehr als zwei Blastomeren zwei oder mehr Pulse erforderlich. Bei allen Embryonen zeigte sich, daß die Fusionsrate je nach Embryonenspender variiert. Das läßt den Schluß zu, daß sich Embryonen in ihrer Empfindlichkeit gegenüber elektrischen Feldern individuell unterscheiden.

Über die Fusion von Kaninchenzweizellern berichteten OZIL und MODLINSKI (1986). Als Fusionsmedium verwendeten sie 0,3 M Glucoselösung. Bei Anwendung eines Fusionspulses mit der Dauer von 35 μ s führten bereits Feldstärken von 1 kV/cm zur Fusion von 27,3 % der Embryonen. Durch Steigerung der Feldstärke wurde die Fusionsausbeute stets größer, bis bei 2,5 kV/cm ein Maximum von 89,6 % erreicht war. Bei Steigerung der Feldstärke auf 3 kV/cm wurde die Fusionsrate wieder geringfügig niedriger (85,0 %). Keiner der Embryonen degenerierte nach der Pulsbehandlung. Alle fusionierten Embryonen entwickelten sich in vitro bis zur Morula weiter. Bei Transfer der

fusionierten Embryonen auf scheinträchtige Empfängertiere zeigte sich, daß die Anzahl der Implantationen mit steigender Feldstärke zunimmt. Zwischen den Tagen 11 und 14 der Trächtigkeit waren 15 Embryonen implantiert, von denen 6 normale Entwicklung zeigten und 9 in ihrer Entwicklung zurückgeblieben, tot oder resorbiert waren.

Bei Anwendung von vier Pulsen der Dauer von 35 μ s konnten die meisten Embryonen (88,4 %) bei einer Feldstärke von 3 kV/cm fusioniert werden. Auch diese Embryonen entwickelten sich alle in vitro bis zu Morulae weiter. Von 54 implantierten Embryonen, die zwischen Tag 11 und 18 der Trächtigkeit untersucht wurden, hatten sich 9 normal entwickelt. Die Karyotypen dreier dieser normal entwickelten Embryonen wurden untersucht und es zeigte sich, daß zwei dieser Embryonen diploid, der dritte ein diploid-tetraploid-Mosaik war. Die anderen implantierten Embryonen waren minderentwickelt, anormal oder resorbiert.

Bei konstanter Feldstärke zeigte sich, daß die Fusionsraten um so größer sind, je kürzer die Pulsdauer gewählt wird. So fusionierten bei einem 35 μ s-Puls und einer Feldstärke von 2,5 kV/cm 86,6 % aller Embryonen, bei einer Pulsdauer von 500 μ s 78,5 % und bei 1000 μ s nur noch 72,3 %. Parallelversuche mit einer Feldstärke von 3 kV/cm ergaben Fusionsausbeuten von 85 % bei einem 35 μ s-Puls und 42,5 % bei 1000 μ s. Bei dieser langen Pulsdauer lysierten bis zu 50 % aller Blastomeren. Die fusionierten Embryonen jedoch entwickelten sich bis zum Blastozystenstadium weiter. Bei der Beobachtung des Fusionsablaufes unter dem Mikroskop zeigte sich, daß etwa zwei bis drei Stunden nach der Pulsauslösung auch die beiden Zellkerne fusionierten. Bei bis zu 14 % der Embryonen jedoch waren kleine Vesikel im Bereich zwischen den Kernen zu sehen, die die Kernfusion verhinderten. Solche Embryonen teilten sich zu Drei- oder Vierzellern und waren somit diploid. Nach Transfer tetraploider Embryonen konnten bis zum 20. Graviditätstag lebende, voll entwickelte Embryonen nachgewiesen werden.

CLEMENT et al. (1988) fusionierten Kaninchenzweizeller innerhalb der Zona pellucida. 71 % der Embryonen fusionierten bei Verwendung einer Feldspannung von 0,58-1,00 kV/cm und sieben Fusionspulsen, die je 50 μ s dauerten. Nach in vivo Kultur über drei Tage hatten sich von 14 transferierten fusionierten Zweizellern vier zu Morulae und drei zu Blastozysten entwickelt.

- Vorkerne und Kerne

Auch für den Transfer von Vorkernen findet die Elektrofusion häufig Anwendung. Bei Mäuseembryonen verglichen TSUNODA et al. (1987) die Fusion von Karyoplasten und enukleierten Eizellen, die einerseits durch inaktivisierte Sendaiviren und andererseits durch Elektrofusion ausgelöst wurde. Die Karyoplasten wurden zur Fusion unter die Zona pellucida der Empfängerzelle injiziert. Bei Anwendung der Elektrofusion wurde mit dem Karyoplasten Phytohaemagglutinin injiziert, um die Zellmembranen zu aggregieren. Mit Hilfe von Mikromanipulatoren wurden die Aggregate so ausgerichtet, daß die Kontaktfläche von Karyoplast und Eizelle senkrecht zu den elektrischen Feldlinien stand. Zwei Pulse im Abstand von 3 Sekunden und der Dauer von 150 μ s bei der Feldstärke von 1,5 kV/cm oder 200 μ s und der Feldstärke von 1 kV/cm lösten die Fusionsvorgänge aus. 78 % der so behandelten Embryonen verschmolzen mit den Karyoplasten. Bei der Anwendung von inaktivierten Sendaiviren dagegen fusionierten 94 %. Obwohl auch die Entwicklungsrate bis zum Morulastadium der durch Elektrofusion erhaltenen kernhaltigen Eizellen schlechter als die von Sendaivirus-behandelten Embryonen war, unterschied sich die Anzahl geborener Tiere aus beiden Methoden nicht signifikant. 23 % der übertragenen Embryonen entwickelten sich nach der Elektrofusion zu Jungtieren gegenüber 31 % nach Sendaivirus-vermittelter Fusion.

STICE et al. (1987) transferierten Kerne von Blastomeren aus Kaninchenachtzellern in enukleierte, aktivierte Oozyten. Auch

hier war die Methode mit inaktivierten Sendaiviren effizienter als mit der Elektrofusionsmethode (78 % Fusionsrate gegenüber 53 %). Nähere Angaben zu den Fusionsbedingungen wurden nicht gemacht.

WILLADSEN (1986) fusionierte isolierte Blastomeren von 8- und 16-Zellembryonen mit Hälften von unbefruchteten Eizellen des Schafes. In Parallelversuchen waren die Fusionsraten bei Verwendung von inaktivierten Sendaiviren (50 %) deutlich geringer als bei Anwendung der Elektrofusion (90 %). Die Hälften der Eizellen waren entweder kernfrei oder kernhaltig, je nachdem ob sie die Metaphase-II-Chromosomen der unbefruchteten Eizelle enthielten oder nicht. Als Fusionsmedium wurde 0,3 M Mannitlösung mit dem Zusatz von 0,1 mM Magnesiumsulfat und 0,05 mM Calciumchlorid verwendet. Die Dielektrophorese schaffte engen Membrankontakt (600 kHz, 0,3 kV/cm), und drei Pulse im Abstand von 0,1 s und der Dauer von 100 μ s lösten den Fusionsprozeß aus. Die Feldstärke betrug 0,75 kV/cm. Nach den Pulsen war über eine weitere Minute das Wechselstromfeld in abnehmender Stärke wirksam, um den Membrankontakt weiterhin aufrecht zu erhalten.

Die fusionierten Embryonen wurden in Agar gebettet und implantierte Eileiter von Mutterschafen transferiert. Nach 4,5 bis 5,5 Tagen wurden sie wieder zurückgewonnen. 42,1 % bzw. 48,3 % der kernfreien Eihälften, die mit Blastomeren von 8- bzw. 16-Zellembryonen fusioniert waren, hatten sich zu Blastozysten weiterentwickelt. Bei den kernhaltigen Eihälften waren es nur 11,4 % bzw. 5,3 %. Nach Transfer von vier der Blastozysten auf Empfängertiere wurden drei Lämmer geboren. Alle drei stammten aus der Fusion von je einer Achtzellerblastomere mit einer kernfreien Eihälfte. In weiteren Versuchen wurde gezeigt, daß Trächtigkeiten auch aus der Fusion von Blastomeren von Sechzehnzellembrionen mit eukleierten Eihälften entstehen können.

Bei bovinen Einzellembrionen war der Austausch von Vorkernen mit Hilfe der Elektrofusion möglich (ROBL et al., 1986b; ROBL et al., 1987). Karyoplasten, die beide Vorkerne enthielten, wurden in den perivitellinen Raum von enukleierten Einzellembrionen injiziert und anschließend mit diesen fusioniert. Nahezu 80 % verschmolzen miteinander. In Vergleichsversuchen mit inaktivierten Sendaiviren fusionierten 8 %. Die Verwendung von bovinen Herpesviren zeigte keinerlei fusionsinduzierende Wirkung. Bei Verwendung eines elektrolytfreien Mediums (Zimmermann Cell Fusion Medium^R) war die Fusionsrate bedeutend größer (89 %) als bei Verwendung von elektrolythaltigem Medium (TL Hepes) (11 %). Vor den Fusionspulsen wurden die Zellen mechanisch ausgerichtet. Bei Feldstärken von 1 bis 1,2 kV/cm zeigte ein Puls der Dauer von 10 μ s keine Fusionswirkung, während Pulse mit 20 oder 40 μ s nahezu dasselbe Fusionsergebnis brachten (79 bzw. 78 %). Die Eizellen mit ausgetauschten Kernen entwickelten sich sowohl in vitro als auch in vivo weiter. Nach Transfer von zwei Blastozysten auf Empfängertiere wurden zwei gesunde Kälber geboren.

In Parallelversuchen, in denen Karyoplasten von 2-, 4- und 8-Zellstadien mit enukleierten Einzellern fusioniert wurden, entwickelten sich die Fusionsprodukte nicht weiter. Wurden statt enukleierter Einzellembrionen unbefruchtete, in vivo oder in vitro gereifte Eizellen als Empfängerzellen verwendet, so konnten sich diese durch die Fusion mit Karyoplasten des 4- bis 32-Zellstadiums bis zu Blastozysten weiterentwickeln (BARNES et al., 1987). Steigerungen der Fusionsraten konnten erzielt werden, wenn bei der Entfernung des Polkörperchens von der unbefruchteten Eizelle etwa die Hälfte des Zytoplasmas mitentfernt wurde und wenn Kerne des 4- bis 16-Zellstadiums verwendet wurden. In vivo gereifte Empfängerzellen zeigten nach Fusion bessere Entwicklungstendenz. 27 % der in vivo und nur 1,9 % der in vitro gereiften entwickelten sich zum Morula- bzw. Blastozystenstadium weiter.

Tab. 5: Elektrofusion von Oozyten, Blastomeren und Kernen: Anwendungsgebiete, Fusionsparameter und Fusionsraten

Art der fusionierten Zellen	Fusionsmedium	Art der Zellaggregation	Pulsanzahl	Pulsdauer (µs)	Pulsabstände (s)	Pulsstärke (kV/cm)	Maximale Fusionsrate (%)	Autoren
Oozyten und Zweizeller (Paracentrotus lividus)	1,2 M Glucoselösung	Dielektrophorese 0,1-0,22 kV/cm 2 MHz	2	50-400	180	0,4	60	RICHTER et al., 1981
Blastomeren von 2- bis 32-Zellern (Maus)	DBS + 20% FKS	keine	1	1000 - 5000	-	1-4	keine Angabe	BERG, 1982
Blastomeren von Blastozysten (Maus)	0,6 M Glucoselsg. + 1 mM CaCl ₂	keine	2	5000	keine Angabe	2	keine Angabe	BERG, 1982
Blastomeren von 2- bis 8-Zellern (Maus)	keine Angabe	keine	1	50-500	-	2-6	keine Angabe	BERG et al., 1983
Blastomeren von Zweizellern (Maus)	0,3 M Mannitlösung	keine	2	1000	0,01-2	1	100	KUBIAK und TARKOWSKI, 1985
Blastomeren von Zweizellern (Kaninchen)	0,3 M Glucoselösung	keine	1	35	-	2,5	69,6	OZIL und MOD-LINSKI, 1986
Karyoplasten/enuklierte Einzeller (Maus)	PBS	PHA	2	150	3	1,5	82	TSUNODA et al., 1987
Blastomeren von 8- oder 16-Zellern/Härfen von unfruchteten Eizellen (Schaf)	0,3 M Mannitlösung + 0,1 mM MgSO ₄ + 0,05 mM CaCl ₂	Dielektrophorese 0,3 kV/cm 600 kHz	2	200	3	1	92	WILLADSEN, 1986
Blastomeren von 2- bis 8-Zellern/unfruchteten Eizellen (Schwein)	keine Angabe	keine Angabe	2	30	keine Angabe	keine Angabe	92	PRATHER et al., 1988
Karyoplasten/enuklierte Einzeller (Rind)	Zimmermann-Cell-Fusion-Medium ⁶	keine	1	40	-	1	100 (5/5)	ROBL et al., 1987
Karyoplasten/gereifte Oozyten (Rind)	keine Angabe	Dielektrophorese	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe	69	BARNES et al., 1987

Durch die Fusion isolierter Blastomeren von 2- bis 8-Zellem-bryonen des Schweines mit enukleierten, unbefruchteten Eizellen konnten teilungsfähige Fusionsprodukte erstellt werden (PRATHER et al., 1988). Zwei Pulse mit der Dauer von je 30 μ s führten zur Fusion von 126 der 137 Zellpaare (92 %). Die Fusionsraten bei Verwendung von verschiedenen Blastomerenstadien unterschieden sich dabei nicht.

Die in der Literatur beschriebenen Anwendungsgebiete, Fusionsparameter und Fusionsraten der Elektrofusion von Oozyten, Blastomeren und Kernen sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

2.1.3.5 Einsatzmöglichkeiten der Fusion

Fusionen werden im Rahmen der Grundlagenforschung und für die Gen- und Biotechnologie eingesetzt (BERG et al., 1984).

Durch die Verschmelzung von Zellen kann Einblick in deren zelluläre Regulationsmechanismen gewonnen werden (SPINDLE, 1981). Von besonderem Interesse ist dabei die Beeinflussung der genetischen Kontrolle und damit der Zellfunktion durch die Fusion von Zellen mit unterschiedlichen Funktionsmustern (OKADA, 1985). Somit bietet sich ein neuer Blickwinkel für die Erforschung von nukleo-zytoplasmatischen Wechselwirkungen (RAO und JOHNSON, 1972).

Gen-Kartierungen werden durch die Erstellung von Hybridzellen ermöglicht (OKADA, 1985). In den Fusionsprodukten erweisen sich gewisse Chromosomen als instabil. Je nach Genzusammensetzung verschwinden die Chromosomen mit der Zeit, wodurch auf deren Zusammensetzung rückgeschlossen werden kann.

Die Fusion von Zellen manipuliert deren Ploidie und ermöglicht die Untersuchung der damit zusammenhängenden Erscheinungen (OZIL und MODLINSKI, 1986). Einsatz finden Fusionen zur Diploidisierung haploider Zellen (SPINDLE, 1981) oder zur

Polyploidisierung diploider Zellen (BERG et al., 1983).

Die Erstellung von Riesenzellen durch Fusion tausender von Zellen bietet der Membranforschung die Möglichkeit, unmittelbar an Zellmembranen Messungen vorzunehmen. Bei entsprechender Größe können Mikroelektroden direkt in eine Zelle eingeführt werden (ZIMMERMANN, 1986).

Für Biologie und Medizin hat sich die Produktion von monoklonalen Antikörpern als hilfreich erwiesen. Über Auswahl der zu fusionierenden Zellen (B-Lymphozyten und Myelomzellen) kann die Spezifität der Antikörper bestimmt werden, die die entstehende Hybridomazelle produzieren soll (OKADA, 1985).

Gentransfer durch Fusion von Zellen mit DNA- oder RNA-beladenen Vesikeln oder Zellen bietet zahlreiche Einsatzmöglichkeiten für die Gentechnologie (SCHAEFER-RIDDER et al., 1982).

Der Kerntransfer, bei dem die Reintegration des entnommenen Zellkernes über einen Fusionsprozeß ablaufen kann, bietet die Möglichkeit, genetisch überragende Tiere zu vervielfachen (BARNES et al., 1987; ROBL et al., 1987).

2.2. KERNTTRANSFER

2.2.1 Entwicklung

Seit LORCH und DANIELLI (1953) und DANIELLI et al. (1955) mit Hilfe interspezifischer Kerntransfers bei Amöben der Spezies *Amoeba proteus* und *Amoeba discoides* feststellten, daß neben dem Zellkern auch zytoplasmatische Faktoren den Zellcharakter bestimmen, wurden zahlreiche Versuche unternommen, die Rolle der Zellkerne abzugrenzen (MARX, 1981). Besonders interessierte dabei die Differenzierung der Kerne von embryonalen Zellen. Durch das Einbringen von Embryonenkernen in Empfängerzellen kann auf die reversible oder irreversible Kerndifferenzierung rückgeschlossen werden.

BRIGGS und KING (1952) berichteten als erste von Kerntransfers bei mehrzelligen Organismen. Aus enukleierten Eizellen von Amphibien (*Rana pipiens* und *Rana catesbeiana*) entwickelten sich nach Injektion eines diploiden Zellkernes von Blastulazellen derselben Spezies Kaulquappen. Dagegen blieb die Entwicklung der Eizellen im Blastulastadium stehen, wenn Kerne einer anderen Spezies injiziert wurden. Durch Transfer von Kernen aus dem Intestinalepithel von Kaulquappen in enukleierte Eizellen wurden später adulte Frösche erzeugt (GURDON, 1977). Dagegen entwickelten sich Eizellen, in die Kerne aus Hautzellen adulter Frösche transferiert worden waren, nur bis zum Kaulquappenstadium weiter (GURDON et al., 1975).

Bestrebungen gingen natürlich bald dahin, Kerntransfers auch bei Säugetieren anwenden zu können. Dies ist jedoch bedeutend schwerer als bei Amphibien, da Eizellen von Säugetieren nur etwa ein Tausendstel des Volumens von Froscheizellen haben und dadurch deren Manipulation erschwert ist (McLAREN, 1984). Kerntransfers wurden dazu benützt, haploide Embryonen durch Entfernung eines Kernes zu erzeugen (MARKERT und PETTERS, 1977), oder tetraploide Embryonen durch Einbringen eines zu-

sätzlichen Zellkernes zu erstellen (MODLINSKI, 1978). Der Austausch von Vorkernen führte wie erwartet zur Entwicklung von Jungtieren (McGRATH und SOLTER, 1983a). Weiterhin wurden Kerne fortgeschrittener Embryonalstadien in befruchtete, enukleierte Eizellen transferiert. Aus diesen Versuchen ging die Geburt von Mäusen (ILLMENSEE und HOPPE, 1981) hervor. Bisher konnte dies jedoch nicht wiederholt werden. Über die Geburt von Lämmern durch Transfer von Kernen fortgeschrittener Embryonalstadien auf unbefruchtete halbierte Oozyten wurde von WILLADSEN (1986) berichtet.

2.2.2 Technik

Der Kerntransfer besteht einerseits aus der Entnahme eines Kernes aus der Spender- oder Donorzelle (Enukleation) und andererseits aus dem Wiedereinbringen des entnommenen Kernes in die Empfänger- oder Rezipientenzelle (Reintegration).

- Enukleation

Die Entnahme des Zellkernes kann mit oder ohne Zerstörung der Donorzelle einhergehen, je nachdem, ob diese wiederum als Rezipientenzelle verwendet werden soll oder nicht. Somit ergeben sich als Möglichkeiten der Enukleation: einerseits die Erstellung einer kernlosen Rezipientenzelle und andererseits die Gewinnung eines für den Transfer verwendbaren Kernes.

PORTER (1939) beschrieb ein Verfahren zur Enukleation von Amphibieneizellen, das später auch von BRIGGS und KING (1952) für den Kerntransfer verwendet wurde. Nach Aufsuchen der Kernspindel wurde mit einer spitzen Nadel die Gallertkapsel und die Eimembran so durchstoßen, daß die Nadel neben und diagonal zur Kernspindel zu liegen kam. Das leichte Aufwärtsbewegen der Nadel schaffte eine kleine Ausstülpung der Eimembran, in der die Kernspindel zu liegen kam. Die Ausstülpung

pung löste sich schnell nach Entfernung der Nadel von der Eimembran ab und die Eizelle blieb unversehrt zurück.

LORCH und DANIELLI (1953) enukleierten Amöben, indem sie mit Hilfe von Mikromanipulatoren den Kern der Spenderzelle durch die Zellmembran hindurch mit einer stumpfen Nadel wegschoben. Hatte die Spenderzelle engen Membrankontakt mit der Empfängerzelle, konnte der Zellkern sofort in die Empfängerzelle weitergeschoben werden.

Um einen Kern ohne die ihn umgebende Zellmembran erhalten zu können, wurde eine Glaspipette verwendet, deren Lumen etwas kleiner als der Durchmesser der Spenderzelle war. Durch Einsaugen der Zelle in die Glaspipette wurde deren Oberfläche so komprimiert, daß die Zellmembran platzte und nur der Zellkern in die Pipette eingesaugt wurde. Diese Methode, von BRIGGS und KING (1952) für die Eukleation von Amphibienzellen verwendet, fand später auch Anwendung für die Eukleation von Säugetierzellen (MODLINSKI, 1981).

HOPPE und ILLMENSEE (1977) stellten eine Eukleationsmethode für Mäuseeizellen vor, die es erlaubt, den Zellkern ohne die ihn umgebende Zellmembran und mit Erhalt der Donorzelle zu gewinnen. Die Methode war bereits von LIN (1971) beschrieben worden, jedoch wurde sie in der Weise modifiziert, daß die Zellen vor der Manipulation mit Cytochalasin B vorbehandelt wurden. Cytochalasin B hebt die Organisation der kontraktile Filamente des Cytoskelettes kurzzeitig auf (LUCHTEL et al., 1976). Die Zellmembran verliert dadurch ihre Spannung, was die Manipulation erheblich erleichtert und die Überlebensrate der Embryonen verbessert. Eine Glaspipette mit dem Außendurchmesser von 8 µm wurde an ihrer Spitze scharf geschliffen und anschließend silikonisiert. Die Verbindung dieser Eukleationspipette mit einem Paraffin-befüllten System, dessen Druck über eine Präzisionspritze reguliert werden konnte, ermöglichte es, nach Einstechen der Pipette und Heranführen an die Vorkerne diese durch eine minimale Sogwirkung in die

Pipette zu ziehen. Durch vorsichtiges und langsames Herausziehen der E nukleationspipette konnte das Auslaufen des Zytoplasmas verhindert werden. Etwa 65 % der Eizellen blieben bei dieser E nukleationstechnik unversehrt.

McGRATH und SOLTER (1983a) entwickelten eine Technik, die die E nukleation einer Eizelle ohne das Durchdringen der Zellmembran ermöglicht. Die Zellen wurden 15 bis 45 Minuten in Cytochalasin B (5 µg/ml) vorbehandelt. Die E nukleationspipette, deren Außendurchmesser 15 bis 20 µm betrug und deren Spitze im Winkel von 45° angeschliffen und zusätzlich noch spitzig ausgezogen war, wurde in den perivitellinen Raum des mittels einer Haltepipette fixierten Embryos gestochen. Die Zellmembran selbst blieb dabei unbeschädigt. Die Pipette wurde zu dem Punkt der Zellmembran vorgeschoben, an dem die Vorkerne anlagen. Über ein Paraffin-befülltes Schlauchsystem, an das die E nukleationspipette angeschlossen war, wurde durch leichten Unterdruck die Zellmembran mit Zytoplasma und den darin enthaltenen Vorkernen in die Pipette eingesogen. Durch kontinuierliches, langsames und vorsichtiges Zurückziehen der Pipette bildete sich eine Zytoplasmabrücke, die immer schmaler wurde. Kurz vor dem plötzlichen Abreißen kam Zellmembran auf Zellmembran zu liegen. Das Zytoplasma und die Kerne blieben somit immer von einer Zellmembran umgeben. Nach Abriß der Zytoplasmabrücke befand sich ein zellmembranumgebener Vesikel in der Pipette, welcher eine geringe Menge Zytoplasma und die Vorkerne enthielt (Karyoplast). 96 % der Embryonen überlebten die Anwendung dieser E nukleationstechnik. Das Aufschlitzen der Zona pellucida vor Beginn der E nukleation erleichterte die Manipulation und machte es überflüssig, eine Spitze an die E nukleationspipette zu ziehen (TSUNODA et al., 1986).

- Reintegration

Das Wiedereinbringen der Zellkerne läuft auf verschiedene Weise ab, je nachdem, ob die entnommenen Kerne von einer

Zellmembran umgeben sind oder nicht.

Bei der von BRIGGS und KING (1952) geschilderten E nukleationsmethode war der entnommene Kern isoliert, also ohne die ihn vorher umgebende Zellmembran entnommen worden und befand sich in der E nukleationspipette. Diese wiederum wurde daraufhin in das Zytoplasma der Empfängerzelle eingestochen, und ein leichter Überdruck setzte den Zellkern in das Zytoplasma ab. Modifiziert wurde diese Methode von ILLMENSEE und HOPPE (1981), die E nukleation und Reintegration mit nur einem Anstich der Zellen ermöglichten. Nach Absetzen des Kernes oder der Vorkerne in das Zytoplasma der Empfängerzelle wird die E nukleationspipette zu den Vorkernen der Empfängerzelle vorgeschoben und diese werden in die Pipette eingesogen. Somit kann die Empfängerzelle zusätzlich als Spenderzelle verwendet werden.

Liegt der Zellkern in Form eines Karyoplasten vor - ist er also von einer Zellmembran umgeben - so muß die Reintegrationsmethode gewährleisten, daß die Zellmembran an dem Ort, an dem der transplantierte Kern zur Wirkung kommen soll, nicht mehr vorhanden ist. Somit bietet sich die Fusion der Karyoplastenmembran mit der Zellmembran der Rezipientenzelle an. McGRATH und SOLTER (1983a; 1983b; 1984) benützten dazu inaktivierte Sendaiviren, die sie mit dem Karyoplasten unter die Zona pellucida der Empfängerzelle injizierten. 99 % der Karyoplasten fusionierten mit der Empfängerzelle. Da Sendaviren trotz Inaktivierung eine gewisse Restaktivität aufweisen können, wollte man diese möglichst nicht für Kerntransferexperimente verwenden. Der Einsatz der Elektrofusion für die Fusion von Karyoplast und Empfängerzelle wurde bei Mäusen (TSUNODA, 1986), Kaninchen (STICE et al., 1987) und Rindern (ROBL et al., 1987) beschrieben.

2.2.3 Anwendung des Kerntransfers bei Säugetieren

ILLMENSEE und HOPPE (1981) übertrugen Kerne der inneren Zellmasse (ICM) oder des Trophektoderms von Mäuseblastozysten auf fertilisierte Mäuseoozyten, deren Vorkerne sie anschließend absaugten. 38 % der Trophektoderm- bzw. 39 % der ICM-Kernempfängerzellen überlebten diese Manipulation. Bei in vitro Kultur blieben die Eizellen, die Trophektodermkerne erhalten hatten, in ihrer Entwicklung stehen, die Empfängerzellen der ICM-Kerne jedoch entwickelten sich bis zum späten Präimplantationsstadium weiter. Von diesen wiederum wurden 16 in vivo kultiviert, woraus die Geburt von drei Jungtieren resultierte. Die fehlende Entwicklung der Zellen, die Trophektodermkerne erhalten hatten, konnte von MODLINSKI (1981) bestätigt werden. Trotz großer Bemühungen gelang es nicht, noch einmal Jungtiere aus dem Transfer von ICM-Kernen zu erhalten (McGRATH und SOLTER, 1984). Es wurde vermutet, daß bei der Enukleationsmethode von ILLMENSEE und HOPPE (1981) Reste des eigenen Kernes in der Empfängerzelle zurückgeblieben waren (McGRATH und SOLTER, 1984). Die Wahrscheinlichkeit, daß die ICM-Kerne noch Totipotenz aufweisen, konnte von McGRATH und SOLTER (1984) ausgeschlossen werden. Bei der Fusion von enukleierten Zygoten mit Karyoplasten, die Kerne von Zweizellembrionen enthielten, teilten sich nur 19 % der Fusionsprodukte bis zum Blastozystenstadium weiter. Bei Verwendung eines Kernes des Vierzellstadiums waren es nur noch 5 % und bei Kernen von Achtzellstadien teilten sich die Fusionsprodukte maximal bis zu Morulastadien weiter. Transferierte man jedoch Kerne des 12- bis 18-Zellstadiums in nicht enukleierte Zygoten, so entwickeln sich in vivo tetraploide Blastozysten (MODLINSKI, 1978).

HOPPE und ILLMENSEE (1982) berichteten später über Geburten von Jungtieren aus dem Kerntransfer von diploiden ICM-Zellen aus parthenogenetisch erzeugten Blastozysten in befruchtete, enukleierte Eizellen. Von 94 Eizellen, die Trophektodermkerne erhalten hatten, entwickelten sich nur vier (4,3 %) bis zum

Morulastadium weiter. Diese Morulae waren anormal geformt und blieben auf dieser Entwicklungsstufe stehen. Von 54 Empfängergzellen, die ICM-Kerne enthielten, teilten sich sechs (11,1 %) bis zum Morula- bzw. Blastozystenstadium weiter. Zwei dieser Embryonen (3,7 %) zeigten das Enzymmuster der parthenogenetischen Zellen. Nach Transfer von sieben Präimplantationsembryonen aus den ICM-Experimenten wurden vier Jungtiere geboren, die alle das Enzymmuster der parthenogenetischen Zellen exprimierten.

Die Schlußfolgerung, die aus diesen Experimenten und vorhergehenden Untersuchungen (HOPPE und ILLMENSEE, 1977) gezogen wurde, nämlich daß männliche und weibliche Erbsubstanz nicht zur Entwicklung eines Individuums notwendig sind, wurde von SURANI und BARTON (1983) und SURANI et al. (1984) mit Hilfe von Enukleations- und Kerntransferexperimenten widerlegt. Sie transferierten männliche oder weibliche Vorkerne in haploide parthenogenetisch erzeugte Eizellen. Die Eizellen, die einen zweiten weiblichen Vorkern erhalten hatten, implantierten zwar nach Transfer, jedoch wurden alle Implantationen resorbiert. Aus dem Transfer von männlichen Vorkernen in 30 parthenogenetische Eizellen jedoch wurden neun Tiere geboren.

Werden beide Vorkerne einer parthenogenetischen Oozyte in eine enukleierte, fertilisierte Oozyte transferiert, implantieren diese Embryonen zwar, entwickeln sich danach aber nicht mehr weiter. Dagegen resultiert aus dem Transfer beider Vorkerne einer befruchteten Eizelle in eine enukleierte, parthenogenetisch erzeugte Oozyte die Geburt normaler Tiere (MANN und LOVELL-BADGE, 1984). Der funktionelle Unterschied, der zwischen männlichem und weiblichem Vorkern besteht, wird weitervererbt. Dies stellten SURANI et al. (1986) mit Hilfe von Kerntransfers fest. Kerne von weiblichen parthenogenetisch erzeugten 2- bis 8-Zellembryonen führten in befruchteten Eizellen nur zur normalen Entwicklung der Embryonen, wenn der weibliche Vorkern der Eizellen beseitigt wurde. 13 bis 18 % der Embryonen entwickelten sich auf diese Weise, dagegen

waren es nur 2 % bei dem Transfer von Kernen des 16-Zellstadiums. Versuche mit Kernen von männlichen parthenogenetischen 2- bis 4-Zellembryonen brachten ähnliche Ergebnisse, wenn der männliche Vorkern der Empfängerzelle beseitigt wurde.

Wenn beide Kerne eines Mäusezweizellers durch Kerne von Achtzellembryonen ersetzt wurden, entwickelten sich 48 % der Embryonen bis zur Blastozyste weiter. Beim Ersatz von Zweizellerkernen durch andere Zweizweizellerkerne entwickelten sich 93 % (ROBL und FIRST, 1985). Bei dem Transfer von Zellkernen von Achtzellern in enukleierte Zygoten von Mäusen entstanden Embryonen, die sich maximal zweimal teilten und anschließend degenerierten (ROBL et al., 1986a).

Die von McGRATH und SOLTER (1983a) beschriebene Technik zum Austausch beider Vorkerne von Mäuseoozyten brachte Überlebensraten der Embryonen von bis zu 91 % mit sich. Nach erfolgreicher E nukleation von 70 der insgesamt 73 behandelten Embryonen konnte der die Vorkerne enthaltende Karyoplast bei 68 Embryonen unter die Zona pellucida injiziert werden. 67 der Embryonen fusionierten anschließend mit dem Karyoplasten, vermittelt durch inaktivierte Sendaiviren. Nach Transfer von 64 dieser Embryonen auf pseudogravide Empfängertiere wurden zehn Jungtiere (16 %) geboren. Beim Transfer von Kontrollembr yonen waren es 15 %. Der Kerntransfer scheint demnach die Lebensfähigkeit der Embryonen nicht zu beeinträchtigen.

TSUNODA et al. (1986) entnahmen die Vorkerne von 344 befruchteten Eizellen der Maus und fusionierten sie ebenfalls mit Hilfe von inaktivierten Sendaiviren in die enukleierten Empfängerzellen. 344 (94 %) wurden auf diese Weise erfolgreich manipuliert. Durch das Aufschlitzen eines kleinen Bereiches der Zona pellucida vor Beginn des Kerntransfers war die Manipulation wesentlich erleichtert. Da mit der E nukleationspipette die Zona pellucida nicht mehr durchstoßen werden mußte, sondern sie durch den Schlitz zur Zellmembran vorgeschoben wurde, konnte eine stumpf endende Pipette verwendet wer-

den. Die Gefahr, mit der Pipette die Zellmembran des Embryos zu verletzen, war so erheblich reduziert worden. Nach in vitro Kultur der Embryonen mit ausgetauschten Kernen teilten sich 20 % bis zum Blastozystenstadium weiter. Bei Elektrofusions-vermittelter Verschmelzung von Karyoplasten und enukleierten Oozyten lag die Fusionsrate bei nur 78 %. Trotzdem unterschieden sich die Anzahlen der aus den Parallelversuchen mit inaktivierten Sendaiviren stammenden Jungtiere nicht signifikant (TSUNODA et al., 1987).

Kerntransferexperimente bei Kaninchen wurden von BROMHALL (1975) beschrieben. Nach Transfer von Morulakernen in unbefruchtete Eizellen mit Hilfe der Injektion konnten jedoch in nur 5 % der Empfängerzellen tatsächlich die radioaktiv markierten Kerne wiederentdeckt werden. Nach Sendaivirus-vermittelter Fusion wurden 18,8 % wiedergefunden. Waren die Spenderzellen vor der Manipulation mit N_2O begast worden, was die Wahrscheinlichkeit erhöht, daß Kerne entnommen werden, die sich gerade in Mitose befinden, so fusionierte in einigen Experimenten nach dem Kerntransfer der haploide Kern der Eizelle mit dem transferierten Kern. Von 155 kultivierten Transferprodukten entwickelten sich vier (2,6 %) zu Morulae weiter, waren jedoch nur diploid.

Bei Transfers von Kernen von Achtzellerblastomeren in enukleierte unbefruchtete Kaninchenoozyten mit Hilfe von Karyoplasten waren inaktivierte Sendaiviren wirksamer als die Elektrofusion. 7 von 9 Karyoplasten fusionierten mit Oozyten durch Hilfe von Sendaiviren, 16 von 30 durch Elektrofusion. Die Aktivierung der Oozyten war jedoch nur durch elektrische Pulse erzielt worden (73 % aktivierte Oozyten). Ein Kälteschock führte bei keiner der Oozyten zur Aktivierung (STICE et al., 1987).

Durch die Fusion von Blastomeren von Schweineembryonen mit enukleierten, unbefruchteten Eizellen wurden Kerne des 2- bis 4-Zellstadiums übertragen (PRATHER et al., 1988). Isolierte

Blastomeren der Mehrzeller wurden unter die Zona pellucida der Oozyten injiziert und mit diesen durch elektrische Pulse fusioniert. Bei insgesamt 79 % der Zellen waren die Manipulationen erfolgreich (86 % überlebende Oozyten nach Enukleation, Fusionsrate 92 %). Nach zwölfstündiger Kultur zeigten die transferierten Kerne eine deutliche Schwellung, die als Aktivitätszeichen interpretiert wurde. Nach Transfer der Embryonen entwickelten sich diese bis zum 59. Tag nach der Übertragung weiter, starben aber vor dem 72. Tag ab. Die Produktion vieler identischer Schweine durch Modifikation der verwendeten Technik wurde in Aussicht gestellt.

Bezüglich der Kerntransferexperimente bei Schafen und Rindern sei auf die Versuche von WILLADSEN (1986), BARNES et al. (1987) und ROBL et al. (1987) verwiesen, die im Kapitel 'Anwendung der Elektrofusion bei Oozyten, Blastomeren und Kernen' beschrieben sind.

Die in der Literatur beschriebenen Kerntransferexperimente sind in der Tabelle 6 zusammengefaßt.

TAB. 6: Kerntransferexperimente bei Säugetieren

Tierart	Kernspenderzelle	Empfängerzelle	Divergenz Kern/ Zytoplasma (Teilungen)	Max. Überlebens- rate nach Enukle- ation und Re- integration (%)	Maximale Ent- wicklungsstufe nach Kultur	Autoren
Maus	Blastomere aus ICM einer Blastozyste	befruchtete, enukle- ierte Eizelle	> 4	39	geborene Tiere (3 von 16 transferier- ten Blastozysten)	ILLMENSEE und HOPPE, 1981
Maus	Blastomere aus ICM einer Blastozyste	befruchtete Eizelle	> 4	14,7	in vitro: Blastozyste	MODLINSKI, 1981
Maus	Blastomere aus TE einer Blastozyste	befruchtete Eizelle	> 4	10,7	in vitro: 5- bis 8-Zeller	MODLINSKI, 1981
Maus	Zweizellerblastomere Vierzellerblastomere Achtzellerblastomere ICM-Blastomere	enukleierte Zygote enukleierte Zygote enukleierte Zygote enukleierte Zygote	1 2 3 > 4	keine Angabe keine Angabe keine Angabe keine Angabe	Blastozyste (19%) Blastozyste (5%) Submorulastadium Submorulastadium (alle in vitro)	McGRATH und SOLTER, 1984
Maus	Zwölf- bis Achtzehn- zellerblastomere	Zygote	2-4	9,6	in vivo: Blastozyste	MODLINSKI, 1978
Maus	TE-Blastomere von parthenogenet. er- zeugter Blastozyste	enukleierte Zygote	>4	30	in vitro: Morulae	HOPPE und ILLMENSEE, 1982
Maus	ICM-Blastomere von parthenogenet. er- zeugter Blastozyste	enukleierte Zygote	>4	52	geborene Tiere	HOPPE und ILLMENSEE, 1982
Maus	weibl. Vorkern aus fertilisierter Oozyte	haploide, partheno- genetische Eizelle	0	59,4	in vivo: Implantation	SURANI et al., 1974
Maus	männl. Vorkern aus fertilisierter Oozyte	haploide, partheno- genetische Eizelle	0	46,2	geborene Tiere	SURANI et al., 1974
Maus	beide Vorkerne von diploider partheno- genetischer Oozyte	enukleierte, ferti- lisierte Oozyte	0	keine Angabe	in vivo: Implantation	MANN und LOVELL-BADGE, 1984

TAB. 6: Kerntransferexperimente bei Säugetieren (Fortsetzung)

Tierart	Kernspenderzelle	Empfängerzelle	Divergenz Kern/ Zytoplasma (Teilungen)	Max. Überlebens- rate nach Enukle- ation und Re- integration (%)	Maximale Ent- wicklungsstufe nach Kultur	Autoren
Maus	beide Vorkerne von fertilisierter Oozyte	enukleierte, ferti- lisierte Oozyte	0	keine Angabe	geborene Tiere	MANN und LOVELL- BADGE, 1984
Maus	Blastomere eines par- thenogenet. erzeugten 2- bis 16-Zellers	fertilisierte Oozyte, der weibl. Vorkern entnommen wurde	1-3	keine Angabe	geborene Tiere	SURANI et al., 1986
Maus	befruchtete Eizelle	enukleierte, be- fruchtete Eizelle	0	91	geborene Tiere	MCCRATH und SOLTER, 1983a
Maus	befruchtete Eizelle	enukleierte, be- fruchtete Eizelle	0	94	in vitro: Blastozyste	TSUNODA et al., 1986
Kaninchen	Blastomere einer Morula	unbefruchtete Eizelle	> 4	100	in vitro: Morula	BROMHALL, 1975
Kaninchen	Blastomere eines Achtzellers	enukleierte, unbe- fruchtete Eizelle	3	keine Angabe	in vitro: Morula	STICE et al., 1987
Schaf	Blastomere eines 8- bis 16-Zellers	Halbte einer enuk- leierten oder nicht enukl., unbefruch- teten Eizelle	3 oder mehr	um 90	geborene Tiere	WILLADSEN, 1986
Schwein	Blastomere eines 2- bis 8-Zellers	unbefruchtete, enuk- leierte Oozyte	1-3	79	in vivo: 59. Gra- viditätstag	PRATHER et al., 1988
Rind	befruchtete Eizelle	enukleierte, be- fruchtete Eizelle	0	keine Angabe	geborene Tiere	ROBL et al., 1987
Rind	Blastomere eines 2- bis 8-Zellers	enukleierte, be- fruchtete Eizelle	1-3	keine Angabe	keine Weiter- entwicklung	ROBL et al., 1987
Rind	Blastomere eines 4- bis 32-Zellers	unbefruchtete, ge- reifte Oozyten	2 bis >4	keine Angabe	in vitro: Blastozyste	BARNES et al., 1987

2.3. DIPLOID-TETRAPLOIDIE

2.3.1 Tetraploide Zellen

Tetraploide Zellen, also Zellen, die einen vierfachen Chromosomensatz besitzen, sind bei adulten Säugetieren sehr selten anzutreffen. Tetraploide Zellen können auf drei Wegen aus diploiden Zellen hervorgehen: erstens, wenn duplizierte Chromosomen in der Anaphase aufgrund eines nicht funktionsfähigen Mitoseapparates nicht normal verteilt werden; zweitens durch Endomitose, bei der die Chromosomenverdoppelung innerhalb der erhalten gebliebenen Kernmembran ohne Spindelbildung abläuft und drittens durch Endoreduplikation, die sich von der Endomitose nur dadurch unterscheidet, daß die Chromosomen entspiralisiert bleiben (ATNIP und SUMMITT, 1971). Beim Menschen entwickeln sich tetraploide Embryonen zunächst, sterben aber nach der Implantation ab (KOHN et al., 1967). In Verbindung mit diploiden Zellen jedoch können tetraploide Zellen überleben, was durch Berichte von geborenen diploid-tetraploid-Mosaiken beim Menschen belegt ist (KOHN et al., 1967; ATNIP und SUMMITT, 1971; KELLY und RARY, 1974). Unbekannt ist nach wie vor die genaue Ursache der eingeschränkten Lebensfähigkeit tetraploider Zellen. Bei Amphibien sind polyploide Zellen keine Seltenheit und führen zu keiner Beeinträchtigung der Individuen (SNOW, 1975).

Um Studien an tetraploiden Zellen machen zu können, wurde versucht, tetraploide Tiere zu erzeugen. HARPER und CHANG (1971) berichteten von der Polyploidisierung von Kaninchenembryonen durch eine mehrstündige bis mehrtägige Behandlung mit Cytochalasin B, welches in der Konzentration von 2,5 µg/ml Kulturmedium zwar die Zytoplasmateilung, jedoch nicht die Kernteilung verhinderte. Durch in vitro Kultur der polyploiden Embryonen konnten Blastozysten erhalten werden, die nach Transfer implantierten, jedoch den 14. Graviditätstag nicht überlebten. SNOW (1975) kultivierte in vitro 2103 tetraploide

Mäuseembryonen, die er durch 12- bis 13-stündige Behandlung mit Cytochalasin B erstellt hatte. 1082 (51,5 %) entwickelten sich bis zur Blastozyste weiter. Gegenüber Kontrollembryonen (86,8 % Entwicklungsrate) war die Entwicklung der tetraploiden Embryonen deutlich reduziert. Die Zellzahl der tetraploiden Blastozysten war auf 38 % der Zellzahl diploider Blastozysten herabgesetzt. Diese Beobachtung stimmt mit einem zwei Jahre zuvor beschriebenen Ergebnis überein (SNOW, 1973). 31,8% der Embryonen, die nach in vitro Kultur in Empfänger-tiere transferiert wurden, implantierten und zeigten bis zum Tag 13 außer signifikant reduzierten Fetusgewichten keinerlei Anormalitäten. Spätere Fetalstadien jedoch wiesen Veränderungen an den Lungen, am Dottersack und an verschiedenen anderen Organen auf. Zwei Tiere wurden nach Transfer geboren, zwei durch Kaiserschnitt entbunden. Alle vier zeigten äußerlich keine Auffälligkeiten. Wenige Stunden nach der Geburt wurden sie jedoch von den Muttertieren gefressen. Die Untersuchung von Geweberesten dreier dieser Tiere zeigte, daß sie tetraploid waren (SNOW, 1975). MODLINSKI (1977) erstellte tetraploide Mäuseembryonen mit Hilfe von Kerntransfers von Morulablastomeren in befruchtete Eizellen und erhielt nach in vitro Kultur tetraploide Blastozysten. Dagegen benützten EGLITIS (1980) und SPINDLE (1981) Polyethylenglycol zur Fusion von Blastomeren, durch die auch sie tetraploide Blastozysten erstellen konnten.

2.3.2 Erstellung von diploid-tetraploid-Mosaiken

Da die Chancen, rein tetraploide lebende Tiere zu erhalten gering sind, gingen Überlegungen dahin, tetraploiden Zellen im Verbund mit diploiden Zellen bessere Überlebenschancen zu geben. Dies erfordert die Erstellung von diploid-tetraploid-Mosaiken oder diploid-tetraploid-Chimären. Im Gegensatz zu Mosaiken stammen die diploiden und tetraploiden Zellen bei Chimären nicht von einem, sondern von zwei Individuen.

Bei den Versuchen von SNOW (1975) zur Erzeugung tetraploider Embryonen waren wenige Embryonen nicht 12 bis 13, sondern nur 8 Stunden der Cytochalasin B-Behandlung ausgesetzt worden. Drei dieser Embryonen waren am Tag 14,5 der Gravidität nachweislich diploid-tetraploid-Mosaik. Die Entstehungsweise eines vierten diploid-tetraploid-Mosaikes konnte nicht erklärt werden. Über den Entwicklungszustand der Embryonen wurde keine Aussage gemacht.

TARKOWSKI et al. (1977) erhielten aus 20 % der Mäuseembryonen, die sie als 3- oder 4-Zellstadien mit Cytochalasin B behandelten, diploid-tetraploid-Mosaik. Die Behandlungsdauer richteten sie je nach den Kontrollembryonen derselben Embryonencharge aus: hatte sich über die Hälfte der Kontrollembryonen in Cytochalasin B-freiem Medium geteilt, so wurden die Cytochalasin B-behandelten Embryonen ebenfalls in zusatzfreies Medium gesetzt. Da nicht alle Zellteilungen eines Embryos synchron ablaufen, entstehen durch die Cytochalasin B-Behandlung Zellen mit doppeltem und Zellen mit vierfachem Chromosomensatz. Die entstandenen vermeintlichen Mosaik bildeten regulär geformte Blastozysten aus, die mehr Zellen besaßen als tetraploide Blastozysten. Die Bestimmung des Karyotyps wies sechs Embryonen als diploid-tetraploid-Mosaik aus.

Bei Transfer von 16 Mosaiken in drei Empfängertiere implantierten 20 Embryonen (75 %). Die Mortalität der Embryonen nach der Implantation war so gering wie bei diploiden Embryonen. Von zwölf untersuchten implantierten Embryonen am 10. und 13. Graviditätstag waren elf normal entwickelt. Ein retardierter Embryo erwies sich als triploid. In allen Eihäuten waren tetraploide oder hypotetraploide Zellen nachzuweisen. Ihr Anteil gegenüber diploiden Zellen schwankte zwischen 0,5 bis 50 %. In nur fünf Fällen jedoch wurden tetraploide Zellen in Embryonen nachgewiesen. Ihr Anteil lag dabei unter 4 %.

Bei Versuchen, tetraploide Kaninchenembryonen durch Elektrofusion von Zweizellembryonen zu erstellen, zeigte sich, daß nach in vitro Kultur der Embryonen nicht nur tetraploide Morulae entstanden waren, sondern auch Morulae, die diploid-tetraploid-Mosaik waren. Bei der Untersuchung von implantierten Embryonen war am Tag 18 der Gravidität einer ein diploid-tetraploid-Mosaik. Dieser Embryo war normal entwickelt. Die Entstehungsweise der Mosaik konnte nicht erklärt werden (OZIL und MODLINSKI, 1986).

CLEMENT-SENCEWALD und BREM (1988) berichteten über Versuche zur Erstellung von diploid-tetraploid-Mosaiken durch Elektrofusion beim Kaninchen. Durch elektrische Pulse wurden Blastomeren innerhalb von 4-, 6-, 8-Zellembryonen oder Morulae fusioniert. Embryonen, die fusionierte und nicht fusionierte Blastomeren aufwiesen, wurden in pseudogravide Empfängertiere transferiert. Die DNA-Gehalte verschiedener Körperzellen geborener Jungtiere wurden mit Hilfe der Cytofluorometrie bestimmt. Von neun untersuchten Tieren zeigten drei erhöhte DNA-Gehalte in je einem Organ.

2.3.3 Erstellung von diploid-tetraploid-Chimären

LU und MARKERT (1980) erstellten bei Mäusen durch die Aneinanderlagerung von diploiden und tetraploiden Embryonen diploid-tetraploid-Aggregationschimären. Die tetraploiden Embryonen entstanden durch Behandlung von Zweizellern mit Cytochalasin B. Mit Hilfe von Phytohaemagglutinin wurde ein tetraploider Embryo mit einem oder zwei diploiden Zweizellembryonen aggregiert. Nach in vitro Kultur bis zum Blastozystenstadium und anschließendem Transfer von 59 Chimären in pseudogravide Empfängertiere wurden 13 Tiere (22 %) geboren. Davon waren vier Tiere (7 %) diploid-tetraploid-Chimären. Zwei der Chimären waren tot geboren worden. Untersuchungen zeigten, daß die Entwicklung der Embryonen um so schlechter vorangeht, je größer der Anteil tetraploider Zellen ist. Eine der beiden

überlebenden Chimären zeigte neurologische Anomalitäten und fehlende Gewichtszunahmen und wurde deshalb eingeschläfert. In der Haut waren etwa 50 % tetraploide Zellen zu finden, im Knochenmark dagegen nur etwa 3 %. Die überlebende Chimäre, die in der Haut etwa 10 % tetraploide Zellen aufwies (Farbmarker), entwickelte sich zu einem fertilen Mäusebock. Die Nachkommen jedoch waren alle diploid.

BAUERNFEIND et al. (1986) berichteten von der Geburt von Jungtieren aus Experimenten zur Erstellung von Aggregationschimären aus tetraploiden Zellen von Vierzellembryonen und diploiden Zellen von Achtzellembryonen. Die geborenen Tiere zeigten Fellfarbenschimärismus mit einer Fellfarbenverteilung von 1:1 und wurden zusätzlich über Glucosephosphat-Isomerase-Marker im Blut als Chimären identifiziert. Tetraploide Zellen wurden durch Chromosomenpräparationen von Knochenmarks- und Testiszellen nachgewiesen. Gegenüber Kontrolltieren, die 1,05 bis 1,14 % tetraploide Zellen im Knochenmark aufwiesen, war der Anteil tetraploider Zellen bei den diploid-tetraploid-Chimären auf 7,05 bis 8,16 % erhöht (BAUERNFEIND und LEIPOLDT, 1987).

3. MATERIAL UND METHODE

3.1 Tiermaterial und Embryonengewinnung

3.1.1 Mäuse

Für die Versuche standen Mäuse der Stämme pop NMRI und C 57 black zur Verfügung. Die weiblichen Tiere hatten ein Alter von 6 bis 10 Wochen und wogen 25 bis 35 g (pop) beziehungsweise 20 bis 30 g (C 57 black). Die männlichen Tiere waren 8 bis 70 Wochen alt und wogen 30 bis 35 g. Alle Tiere wurden in einem Versuchsstall in Gruppen zu 6 bis 8 Mäusen pro Käfig gehalten. Die Käfiggrundfläche betrug 30 x 40 cm. Empfänger-tiere, in die Embryonen transferiert worden waren, wurden nach Transfer in Einzelkäfige mit der Grundfläche von 20 x 30 cm gesetzt. Ein Lichtprogramm regelte den 12-stündigen Tag- und 12-stündigen Nachtrhythmus. Die Stalltemperatur betrug zwischen 18°C und 21°C. Mäusefertigfutter (Altrumin^R) und Wasser wurden ad libitum angeboten.

Embryonenspendertieren wurden zur Superovulation 10 I.U. PMSG intraperitoneal injiziert (Intergonan^R, Vemie). Nach 48 Stunden folgte eine intraperitoneale Injektion von 10 I.U. HCG (Ekluton^R, Vemie) zur Ovulationsauslösung. Nach dieser Injektion wurde jeweils ein Tier zu einem Mäusebock gesetzt und eine erfolgte Belegung am nächsten Tag durch Plaque-Kontrolle überprüft. Tiere mit Vaginalplaque wurden als Embryonenspende-der herangezogen.

Nicht superovulierte Spendertiere wurden in Zweiergruppen zu je einem Mäusebock gesetzt und jeden Morgen auf Vorhandensein eines Vaginalplaques untersucht. Plaque-positive Tiere wurden in einem separaten Käfig gepoolt und als Embryonenspende-herangezogen.

Mäuse, die als Spender von Zweizellembryonen dienen sollten, wurden am Tag 1 nach Beobachten des Vaginalplaques schmerzlos getötet, Spender von Achtzellern oder Morulae wurden am Tag 2 nach Plaque getötet. Nach Befeuchten der Bauchregion mit 70%-igem Methanol wurde die Bauchhöhle des Tieres mit Hilfe einer Schere eröffnet, die Eileiter beidseitig an den Eierstöcken und am Übergang zu den Gebärmutterhörnern abgesetzt und mit einer sterilen Pinzette in einen Tropfen Kulturmedium (siehe 3.3) in eine Kulturschale verbracht. Unter einem Stereomikroskop (Wild M 8) mit Auflicht wurden bei 20-facher Vergrößerung mit Hilfe zweier feiner, beidseits spitz zugeschliffener steriler Pipetten die Eileiter in Stücke von etwa 1 mm Größe zerlegt.

Für die Gewinnung von Morulae wurden zusätzlich zu den Eileitern die beiden Gebärmutterhörner des Spendertieres entnommen und mit Medium durchgespült. Die Gewebestücke wurden vorsichtig in dem Mediumtropfen hin- und herbewegt und anschließend entfernt. Auf diese Weise kamen die Embryonen auf den Boden der Kulturschale zu liegen, wo sie mit einem Transferpettor aufgesammelt und in frischen Mediumtropfen dreimal gewaschen wurden. Die Aufbewahrung der Embryonen erfolgte in Mediumtropfen, die mit je nach verwendetem Medium äquilibriertem Paraffinum liquidum (DAB 7) abgedeckt waren bei 37°C (je nach Medium mit oder ohne Begasung).

Empfängertiere wurden zur Ausnützung des Whitten-Effektes in Gruppen von acht Tieren in Käfige gesetzt, in denen zuvor fertile Mäuseböcke saßen. Zwei Tage später wurden je zwei Mäuse zu einem vasktomierten Mäusebock gesetzt und beginnend am nächsten Tag jeden Morgen auf Vorhandensein eines Vaginalplaques untersucht. Plaque-positive Tiere wurden gepoolt und bis zu ihrer Verwendung in einem separaten Käfig gehalten.

3.1.2 Kaninchen

Für die Versuche standen zugekaufte ZIKAR^R-Hybridkaninchen (Basiszucht: Dr. Erich Zimmermann), Kalifornier und Kreuzungstiere aus eigener Nachzucht zur Verfügung. Die weiblichen Tiere waren drei bis fünf Monate alt. Ihr Gewicht betrug 3 bis 4,5 kg. Die Rammler hatten ein Alter von 9 Monaten bis drei Jahren und wogen 5 bis 6 kg. Die Kaninchen waren in einem Versuchsstall untergebracht, dessen Temperatur bei 17°C lag. Ein Lichtprogramm gab einen 14-stündigen Licht- und 10-stündigen Dunkelrhythmus vor. Die Tiere waren einzeln in Käfigen mit der Grundfläche von 60 x 70 cm aufgestellt. Empfängertieren, denen Embryonen übertragen worden waren, wurden wenige Tage vor dem errechneten Geburtstermin Nistkästen mit eingestreutem Stroh in den Käfig gestellt. Die Fütterung erfolgte mit Kaninchenzuchtfutter in Pelletform, das folgende Zusammensetzung aufwies: 16 % Rohprotein, 16 % Rohfaser, 2 % Rohfett, 9 % Rohasche, Vitamine A, D₃ und E. Jedes Tier erhielt eine tägliche Ration von 75 g, zusätzlich wurden Heu und Wasser ad libitum zur Verfügung gestellt. Laktierenden Kaninchen wurde das Zuchtfutter ad libitum zur Verfügung gestellt.

Alle Embryonenspendeure wurden mit einer subkutanen Injektion von 40 I.U. PMSG pro kg Körpergewicht superovuliert (Intergonan^R, Vemie oder Seragon^R, Ferring GmbH). Drei Tage später wurden die Tiere im natürlichen Deckakt zweimal belegt oder zweimal mit 2 bis 3 ml Frischsperma künstlich besamt. Nach dem Deckakt oder der künstlichen Besamung erhielten sie eine intravenöse Injektion von 120 I.U. HCG (Ekluton^R der Fa. Vemie) zur Synchronisation.

Zur Gewinnung der Embryonen wurden die Spendertiere nach Betäubung durch Entblutung getötet. Zur Gewinnung von Zwei- bis Vierzellembryonen fand die Schlachttötung 22 bis 30 Stunden nach dem Deckakt, von Vier- bis Achtzellembryonen 30 bis 36 Stunden und von Morulae 36 bis 60 Stunden nach dem Deckakt

statt. Nach Eröffnung der Bauchhöhle wurden beidseits die Eierstöcke, Eileiter und ein etwa 1 cm langes Stück der Uterushornspitzen zusammenhängend entnommen. Die Ovarien und Eileiterbänder wurden anschließend abpräpariert. Nach Streckung des Eileiters wurde die anhängende Uterushornspitze in eine Petrischale gelegt und eine abgeschliffene stumpf endende Kanüle (0,9 x 40 mm) in das Infundibulum tubae eingeführt. Durch langsames und vorsichtiges Injizieren von 6 bis 7 ml Spülflüssigkeit (BSM 2 oder PBS mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS)) wurde der Eileiter in Richtung des Uterushornes durchgespült. Die Embryonen kamen auf diese Weise in der Petrischale zu liegen, in der sie mit Hilfe eines Stereomikroskopes (Wild M 8) bei 40-facher Vergrößerung gesucht wurden. Das vorherige Aufzeichnen eines Rastermusters auf dem Boden der Petrischale erleichterte das systematische Durchsuchen der Spülflüssigkeit. Nach Aufnahme der Embryonen in einen Transferpettor wurden diese in Mediumtropfen (BSM 2 oder PBS mit 10 % FKS) unter Paraffin dreimal in jeweils frischen Tropfen gewaschen und anschließend in einem vierten frischen Mediumtropfen aufbewahrt.

Empfängertiere erhielten zur selben Zeit wie die Spendertiere eine einmalige intravenöse Injektion von 120 I.U. HCG (Ekluton^R, Vemie) zur Ovulationsauslösung.

3.1.3 Schweine

Für die Versuche standen präpuberale Tiere der Deutschen Landrasse und Tiere aus Kreuzungen von Deutscher Landrasse x Pietrain oder Deutscher Landrasse x Deutsches Edelschwein zur Verfügung. Die Tiere hatten ein Gewicht von 60 bis 80 kg. Sie waren in Laufboxen mit Spaltenboden aufgestellt. Alleinmastfutter wurde über Futtertröge verabreicht. Wasser stand über Nippeltränken ad libitum zur Verfügung.

Mit 1250 I.U. PMSG (Intergonan^R, Vemie) pro Tier wurde die Follikelbildung bei Embryonenspendertieren stimuliert. Nach 72 Stunden wurde die Ovulation durch die Injektion von 750 I.U. HCG (Ekluton^R, Vemie) pro Tier ausgelöst. 24 und 36 Stunden später wurden die Tiere besamt. 27 bis 30 Stunden nach der zweiten Besamung wurden die Zweizellembryonen auf folgende Weise gewonnen (SPRINGMANN und BREM, 1988):

nach Narkotisierung mit 160 mg Azaperon (Stresnil^R, Janssen) und 400 mg Metomidat-hydrochlorid (Hypnodil^R, Janssen) pro Tier wurde die Operationsstelle gereinigt und nach Ausbinden des Tieres in Rückenlage desinfiziert und mit einem sterilen Tuch abgedeckt. In Höhe der letzten beiden Zitzenpaare wurde die Haut median über die Länge von 10 cm durchschnitten. Nach stumpfer Durchtrennung der Bauchmuskulatur und Freipräparation der Linea alba wurde die Bauchhöhle eröffnet und die Ovarien, Eileiter und Gebärmutterhörner vorgelagert. 5 cm vom Übergang des Eileiters in die Gebärmutter wurde die Gebärmutter stumpf perforiert und durch diese Öffnung eine 15 cm lange und 1 cm dicke Glaskanüle in das Uteruslumen eingeführt und fixiert. Eine gebogene, 8 cm lange Augenkanüle wurde in den Fimbrientrichter eingeführt und mit Hilfe eines aufgesetzten Schlauches wurden 50 ml PBS durch den Eileiter gespült. Die aus der Glaskanüle ausfließende Flüssigkeit wurde in einer sterilen Petrischale aufgefangen und anschließend unter einem Stereomikroskop bei 12- bis 20-facher Vergrößerung nach Embryonen durchsucht. Die gefundenen Embryonen wurden in PBS + 20 % LS (Lammserum) gewaschen und darin unter Paraffin aufbewahrt.

3.2 Elektrofusion

3.2.1 Herstellung der Fusionskammern

Zur Elektrofusion wurden Fusionskammern aus eigener Herstellung verwendet. Zwei Drähte (100 µm Ø) aus rostfreiem Stahl wurden mit Hilfe zweier Tropfen eines Zweikomponentenklebers

parallel auf einen Glasobjektträger so aufgeklebt, daß sie in der Mitte des Objektträgers straff und vollständig auf dem Glasboden zu liegen kamen. In diesem mittleren Bereich durfte kein Klebstoff vorhanden sein, da dieser zytotoxische Wirkung auf die Embryonen haben kann. Der Abstand zwischen den parallelen Drähten betrug 200 bis 340 μm . Ein 5 cm langes Ende wurde jedem Draht belassen, um an ihm die Klemmen des Verbindungskabels zum Fusionsapparat fixieren zu können (Abb.2).

Abbildung 2: Fusionskammer (Aufsicht)



Nach dem Gebrauch wurden die Fusionskammern 5 Minuten im Ultraschallbad gereinigt, anschließend in Aqua dest. geschwenkt, mit 70%igem Methanol desinfiziert und luftgetrocknet. Um die Verstaubung zu verhindern erfolgte die Aufbewahrung in verschlossenen Plastiktütchen.

3.2.2 Embryonenvorbereitung

Unmittelbar vor Beginn der Elektrofusion wurden alle zur Verfügung stehenden Embryonen unter einem Stereomikroskop (Wild M 8) bei 50-facher Vergrößerung beurteilt. Embryonen, die eines oder mehrere der nachfolgend aufgeführten Kriterien nicht erfüllten, wurden aussortiert und nicht für Fusionszwecke verwendet:

- dem Alter des Embryos entsprechendes Teilungsstadium
- intakte und damit klar abgrenzbare Zellmembranen
- gleichmäßig große Blastomeren

- homogenes Zytoplasma der Blastomeren
- keine Anzeichen von Fragmentation
- intakte Zona pellucida.

Vor Einsetzen der zu fusionierenden Embryonen in die Fusionskammer wurden diese in vier Tropfen Fusionsmedium mit Hilfe eines Transferpettors sorgfältig gewaschen. Für alle Versuche wurde Mammalian Cell Fusion Medium^R (CGA Corporation) verwendet. Dies ist ein nahezu ionenfreies Medium mit sehr geringer elektrischer Leitfähigkeit. Die Tropfen zum Waschen der Embryonen waren auf den Boden einer Petrischale aufgebracht und auf einer Wärmeplatte auf 37°C erwärmt worden. Sie wurden nicht mit Paraffin überschichtet, um das Anhaften des Paraffins an den Transferpettor und damit das Einbringen von Ionen in das Fusionsmedium der Fusionskammer zu verhindern.

3.2.3 Fusionsversuche

Eine Fusionskammer wurde auf den Tisch eines inversen Mikroskopes (Wilovert^R, Will) gelegt und in der Mitte mit 0,3 ml Mammalian Cell Fusion Medium^R tropfenförmig bedeckt. An den beiden Drahtenden der Elektroden wurden die Klemmen zur Verbindung mit dem Fusionsapparat fixiert. In allen Versuchen wurde derselbe Fusionsapparat (Zimmermann Cell Fusion Instrument^R, CGA/Precision Scientific Group, Chicago, IL) verwendet, der durch Erzeugung eines Wechselstromfeldes und Erzeugung von Gleichstromeimpulsen die Anwendung der Dielektrophorese und Elektrofusion ermöglicht (Abb.3).

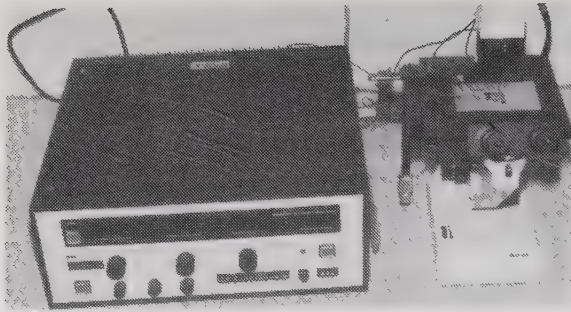


Abbildung 3:
Geräteaufbau für
die Elektrofusion

links Fusions-
apparat, rechts
Fusionskammer auf
Mikroskoptisch
(Wilovert^R)

Vor Einbringen der Embryonen in die Fusionskammer wurden die gewünschten Dielektrophorese- und Fusionsparameter am Fusionsgerät eingestellt. Folgende Parameter wurden in den Versuchen variiert:

Dielektrophorese

- Alignmentdauer: Dauer der Einwirkung des Wechselfeldes auf die Embryonen (1-90 s)
- Duty cycle: Zeitanteil, in dem das Wechselfeld während des Alignments eingeschaltet ist (2 oder 100 %)

Elektrofusion

- Anzahl der Fusionspulse (1-9)
- Pulsdauer (30-90 μ s)
- Spannung der Fusionspulse (0,3-2,0 kV/cm)

Die nachfolgenden Parameter wurden bei allen Versuchen konstant gehalten:

Dielektrophorese

- Wechselstromfrequenz: 0,6 MHz
- Spannung des Wechselfeldes: 6 V für alle verwendeten Elektrodenabstände

Elektrofusion

- Abstände zwischen den Fusionspulsen: 0,1 s
- Abschalten des Wechselfeldes zwischen den Fusionspulsen

Nach Überführen der Embryonen in den Spalt zwischen den beiden Elektroden der Fusionskammer mit Hilfe eines Transferpettors wurde Wechselstrom angelegt. Der Vorgang wurde unter dem Mikroskop beobachtet und die Fusionspulse bei Zweizellembrionen erst dann ausgelöst, wenn sich diese in die richtige Fusionsposition (Kontaktfläche der Blastomerenmembranen senkrecht zu den Feldlinien) gedreht hatten und diese Position beibehielten (Abb.4 und 5).

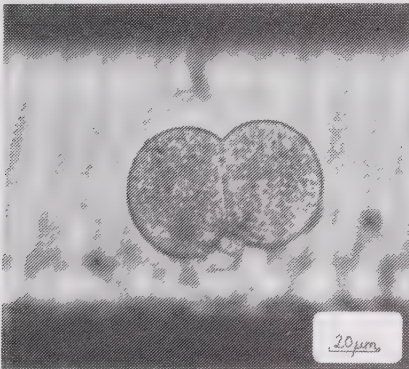


Abbildung 4:
Mäusezweizeller im Spalt
der Fusionskammer vor dem
Anlegen des Wechselstrom-
feldes

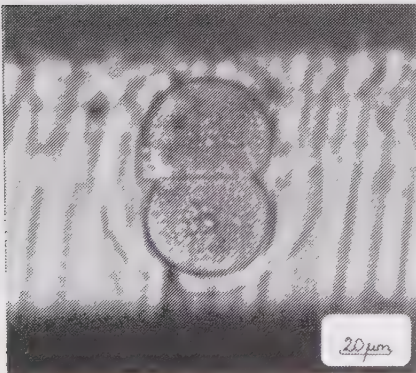


Abbildung 5:
Mäusezweizeller im Spalt
der Fusionskammer nach An-
legen des Wechselstromfel-
des; Kontaktfläche der
Blastomeren senkrecht zu
den Feldlinien

Die Anwendungsdauer des Wechselstromes für die Fusion von Mehrzellembryonen war nicht von deren Drehung abhängig. In allen Versuchen wurde nach den Fusionspulsen erneut für 30 Sekunden Wechselstrom angelegt, dessen Spannung innerhalb dieser Zeit von 6 V auf 0 V kontinuierlich reduziert wurde. Dies bewirkte nach den Fusionspulsen über weitere 30 Sekunden hinweg die Aufrechterhaltung des durch das Wechselfeld erzeugten engen Membrankontaktes.

Nach Abklingen des Wechselfeldes wurden die Embryonen mittels eines Transferpette aus der Fusionskammer in Kulturmediumtropfen unter Paraffin überführt und in drei Tropfen gewaschen. Je nach Art des verwendeten Mediums wurden die Kulturschalen im Brutschrank bei Begasung oder auf Wärmeplatten bei Raumatmosphäre aufbewahrt.

3.2.4 Embryonenbeurteilung

Eine Stunde nach Auslösung der Fusionspulse wurden die Embryonen unter einem Stereomikroskop (Wild M 8) bei 50-facher Vergrößerung morphologisch beurteilt. Alle aufgeführten Kriterien mußten erfüllt sein.

- Zweizellembryonen

Fusionierter Zweizeller:

eine große runde Zelle, die keinerlei in die Mitte der Zelle ziehende Membranreste aufwies und die zwei Zellkerne beinhalten; die Zellmembran war klar gezeichnet und glatt; das Zytoplasma war homogen verteilt.

Nicht fusionierter Zweizeller:

zwei durch Zellmembranen erkennbar getrennte Blastomeren; die Blastomerenmembranen waren klar gezeichnet und glatt; das Zytoplasma der Blastomeren war homogen verteilt.

Degenerierter Zweizeller:

die Zellmembranen einer entstandenen großen runden Zelle oder der verbliebenen beiden Blastomeren waren unscharf oder rau; das Zytoplasma war ungleichmäßig verteilt und wies hellere und dunklere Regionen auf; Fragmentation war zu erkennen.

Ein Zweizeller, der eines oder mehrere dieser Kriterien aufwies, galt als degeneriert.

- 3- bis 8-Zellembryonen, frühe und kompaktierte Morulae

Fusionierter Mehrzeller:

zwei oder mehrere Blastomeren waren zu einer oder mehreren größeren Blastomeren fusioniert; alle Blastomeren hatten klar gezeichnete und glatte Zellmembranen; das Zytoplasma der Blastomeren, die beurteilt werden konnten, war homogen verteilt.

Diploid-tetraploid-Mosaik:

der Mehrzeller beinhaltete sowohl durch Fusion zweier Blastomeren entstandene Zellen als auch nicht fusionierte Blastomeren; alle Blastomeren hatten klar gezeichnete und glatte Membranen; das Zytoplasma der Blastomeren, die beurteilt werden konnten, war homogen verteilt.

Mehrzeller mit unsicherem Fusionsergebnis:

der Mehrzeller wies wenige Blastomeren auf, die sich geringgradig in ihrer Größe von den übrigen Blastomeren unterschieden; in keiner dieser größeren Blastomeren waren eindeutig zwei Zellkerne zu erkennen; die Zellmembranen aller Blastomeren waren klar gezeichnet und glatt; das Zytoplasma der Blastomeren, die beurteilt werden konnten, war homogen verteilt.

Nicht fusionierter Mehrzeller:

alle Blastomeren des Mehrzelllers waren gleich groß und beinhalteten einen Zellkern; die Zellmembranen aller Blastomeren waren klar gezeichnet und glatt; das Zytoplasma der Blastomeren, die beurteilt werden konnten, war homogen verteilt.

Degenerierter Mehrzeller:

die Zellmembran einer oder mehrerer Blastomeren war unscharf oder rau; das Zytoplasma einer oder mehrerer Blastomeren war ungleich verteilt und wies somit hellere und dunklere Regionen auf; Fragmentation war zu erkennen.

Ein Mehrzeller, der eines oder mehrere dieser Kriterien aufwies, galt als degeneriert.

3.3 In vitro Kultur von fusionierten Embryonen und Kontroll-embryonen

Zur Beurteilung der Entwicklungspotenz fusionierter Embryonen im Gegensatz zu unbehandelten Embryonen wurden diese in Gruppen von 2 bis 10 Embryonen in Kulturmediumtropfen (0,1-0,2 ml) unter Paraffin gesetzt. Unbehandelte Embryonen wurden auf dieselbe Weise behandelt und dienten als Kontrollen. Wenn es erforderlich war, wurden die Kulturschalen begast. Alle Embryonen wurden bei 37°C kultiviert. In der Tabelle 7 ist die Zusammensetzung der für die Kulturen von Mäuseembryonen verwendeten Medien aufgelistet.

Für die Kultur von Kaninchenembryonen wurde PBS + 10 % FKS oder Basal Synthetic Medium (Fa. Gibco) verwendet. Beide Medien wurden in Luft oder bei 5 % CO₂ in Luft bei 95 % relativer Luftfeuchtigkeit verwendet.

Schweineembryonen wurden ausschließlich in PBS + 20 % Lammserum in Luft oder bei 5 % CO₂ in Luft bei 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Alle Kulturmedien wurden vor Gebrauch sterilfiltriert. In 24-stündigem Abstand wurde der Entwicklungszustand der kultivierten Embryonen unter einem Stereomikroskop bei 50-facher Vergrößerung beurteilt.

TAB. 7: Kulturmedien für Mäuseembryonen

Bezeichnung	Zusammensetzung (Mengen pro 1 l Aqua#)	Kulturbedingungen
PBS + 20% FKS (Phosphate- buffered-sa- line Dulbec- co + 20% FKS)	0,200 g KCl 0,200 g KH_2PO_4 0,047 g MgCl_2 8,000 g NaCl 1,150 g NaH_2PO_4 0,100 g CaCl_2 + 200 g FKS	in Luft oder bei 5% CO_2 in Luft*
Whitten's Medium modifiziert nach HOPPE (ILLMENSEE, 1987)	6,400 g NaCl 0,356 g KCl 0,162 g KH_2PO_4 0,294 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,900 g NaHCO_3 1,000 g D-Glucose 0,025 g Na-Pyruvat 0,372 g Ca-Lactat 0,075 g K-Penicillin 0,050 g Streptomycin · SO_4 3,000 g BSA 1 ml Phenolrot	bei 5% CO_2 in Luft* oder bei 5% CO_2 5% O_2 * 90% N_2 *
M 2 (modifizier- te Krebs-Rin- ger-Lösung)	5,533 g NaCl 0,356 g KCl 0,252 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,162 g KH_2PO_4 0,293 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,349 g NaHCO_3 4,969 g HEPES 2,610 g Na-Lactat 0,036 g Na-Pyruvat 1,000 g Glucose 4,000 g BSA 0,060 g Penicillin G - K-Salz 0,050 g Streptomycinsulfat 0,010 g Phenolrot	in Luft oder bei 5% CO_2 in Luft*

*: bei 95 % relativer Luftfeuchtigkeit

FKS: fetales Kälberserum

#: Aqua millipore mit geringem Anteil
anorganischer Salze, organischer
Bestandteile, Kolloide; pyrogenfrei

3.4 In vivo Entwicklung von fusionierten Embryonen und Kontrollembrionen

Ein Teil der fusionierten Embryonen und Kontrollembrionen wurde bei der Maus und beim Kaninchen in pseudogravide Empfängertiere transferiert. Pro Seite wurden jedem Empfängertier zwischen 2 und 28 Embryonen übertragen. Sollten die Embryonen nach wenigen Tagen Kulturdauer durch Spülung des getöteten Empfängertieres wiedergewonnen werden, so wurden fusionierte Embryonen in einen, Kontrollembrionen in den anderen Eileiter transferiert. Sollte das Empfängertier austragen, so wurden fusionierte und Kontrollembrionen aus verschiedenen Stämmen verwendet, so daß die geborenen Tiere an Hand der genetisch unterschiedlichen Augen- und Fellfarben zugeordnet werden konnten.

3.4.1 Maus

Nach Narkotisierung des Empfängertieres durch intraperitoneale Injektion von 0,2 bis 0,4 ml einer Mischung aus 2 ml 5%igem Ketanest^R (WDT) und 0,25 ml 2%igem Rompun^R (Bayer) wurde dieses in Bauchlage gebracht. Die gesamte Rückenregion des Tieres wurde mit 70%igem Methanol benetzt und die Haare seitlich kaudal der Rippenbögen entfernt. Mit einer Schere wurde Haut, Unterhaut und Bauchfell kaudal des linken Rippenbogens auf einer Länge von 0,5 bis 0,8 cm durchgeschnitten. Mit Hilfe einer Pinzette wurden Eierstock, Eileiter und Spitze des Uterushornes vorgelagert. Das Tier wurde unter ein Stereomikroskop (Wild M 8) mit Auflicht in Bauchlage gelegt. Alle weiteren Manipulationen wurden unter Zuhilfenahme des Mikroskopes bei 20- bis 30-facher Vergrößerung vorgenommen.

Die Bursa ovarica wurde mit Hilfe zweier feiner Pinzetten eröffnet und das Ovar mit dem Infundibulum tubae vorgelagert. Durch Aufsuchen von Ovulationsstellen am Ovar wurde kontrolliert, ob das Empfängertier ovuliert hatte. Die Embryonen

wurden in eine von Hand ausgezogene, etwa 8 cm lange und an ihrer Spitze 250-300 µm dicke Glaspipette aufgenommen. Dies geschah mit Hilfe eines auf die Pipette aufgesetzten Schlauches mit Mundstück, über den Sog mit dem Mund ausgeübt werden konnte. Die Pipette hatte 1 cm von ihrer Spitze entfernt einen Knick von ca. 20° um das Einführen der Pipette in das Infundibulum tubae zu erleichtern. Vor Aufsaugen des Mediums mit den Embryonen wurde etwas Medium und dann Luft in die Pipette aufgenommen, um ein sicheres Absetzen der Embryonen zu gewährleisten. Nach Aufsaugen der Embryonen wurde wiederum etwas Luft angesaugt, um das Auslaufen der Pipette bei Gewebekontakt zu verhindern.

Die Pipettenspitze wurde nach Aufziehen der Embryonen in das Infundibulum tubae eingeführt und die Embryonen abgesetzt. Das erfolgreiche Absetzen der Embryonen war durch das Erscheinen der Luftbläschen im Eileiter kontrollierbar. Ovar und Eileiter wurden in die Bauchhöhle zurückverlagert und das Bauchfell, die Unterhaut und die Haut wurden mit einer Michelklammer (7,5 x 1,8 mm) geschlossen. Anschließend wurden die Embryonen in gleicher Weise in den rechten Eileiter transferiert.

Zur Wiedergewinnung in vivo kultivierter Embryonen wurde das Empfängertier schmerzlos getötet. Die Spülung erfolgte wie im Kapitel 3.1.1 beschrieben, jedoch wurden mit den Eileitern die gesamten Uterushörner entnommen und jede Seite separat gespült.

3.4.2 Kaninchen

Zehn Minuten vor Narkotisierung des Empfängertieres erhielt das Kaninchen eine subcutane Injektion von 0,4 ml einer 0,1%igen Atropinlösung als Prämedikation. Die Narkotisierung erfolgte durch die subcutane Injektion einer Mischspritze aus 0,2 ml 2%igem Rompun^R (Fa. Bayer) und 1,0 ml 5%igem Ketanest^R

(Fa. WDT) pro kg Körpergewicht. Der kaudale Abdominalbereich wurde geschoren und rasiert. Anschließend wurde das Tier in Rückenlage auf dem Operationstisch ausgebunden. Die Bauchregion wurde mit Kodan^R Spray desinfiziert und mit Sprühklebstoff (Liquidoplast^R) besprüht. Nach Aufkleben eines sterilen Plastikabdecktuches (Größe 60 x 90 cm) und zusätzlicher Fixierung mittels zweier Tuchklemmen wurde der Operationstisch gekippt, so daß der Kopf des Kaninchens nach unten hing. Dies erleichterte die Operation, da das Darmkonvolut nach cranial verlagert wurde und die Uterushörner dadurch leichter aufzufinden und vorzulagern waren.

Durch einen Schnitt in der Linea alba von 1 cm kaudal des Nabels bis 1 cm kranial des letzten Zitzenpaares wurde die Bauchhöhle eröffnet. Nach Vorlagerung des linken Ovars mit Eileiter und dessen Übergang in die Uterushornspitze wurde das Ovar auf Ovulationsstellen untersucht. Nachdem sicher war, daß das Empfängertier ovuliert hatte, wurden die zu übertragenden Embryonen mit Hilfe einer auf einen verbindenden Schlauch aufgesetzten Spritze in ein 20 µl fassendes Transferpettorcap aufgesogen. Das Cap, dessen Ende halbrund gebogen war, wurde zuerst mit etwas Luft, dann mit Medium und den darin befindlichen Embryonen und anschließend wieder mit etwas Luft befüllt. Das befüllte Cap wurde in das Infundibulum tubae eingeführt und so weit wie möglich in den Eileiter vorgeschoben.

Das erfolgreiche Absetzen der Embryonen mit Hilfe von Überdruck im Spritzen/Schlauchsystem konnte am Auftreten kleiner Luftblasen im Eileiter überprüft werden. Nach vorsichtigem Entfernen des Caps aus dem Eileiter wurde dieser mit Ovar und Uterushornspitze in die Bauchhöhle zurückverlagert und die gesamte Vorgehensweise für den Transfer von Embryonen in den rechten Eileiter wiederholt. Die Operationswunde wurde in drei Schichten geschlossen: das Peritoneum und die Muskelschichten durch U-Hefte (Catgut 3,5 metric), die Unterhaut mit fortlaufender Naht (Catgut 3,5 metric) und die Haut mit

U-Heften (Supramid^R, 0,3 mm). Anschließend wurde eine 2 cm dicke und 9 cm lange Tupferrolle mit drei Heften über die mit Wundpuder bestäubte Operationswunde genäht. Auf diese Weise konnte das Benagen der Wundnaht durch das Tier eingeschränkt werden.

Über drei Tage nach der Operation hinweg wurden die Empfängerkaninchen systemisch mit Antibiotika versorgt (1,5 ml Streptocombin^R, Albrecht). Am Tag 8 post operationem wurde die Tupferrolle entfernt. Die Hautfäden wurden am Tag 14 gezogen.

Zur Wiedergewinnung in vivo kultivierter Embryonen wurden nach Betäubung und Schlachttötung des Empfängertieres die Eileiter und die gesamten Uterushörner mit den Cervices je Seite separat entnommen. Nach Abtrennung des Eileiters vom Uterushorn wurde dieser, wie in Kapitel 3.1 beschrieben, durchgespült. Mit einem Scherenschlag wurde das Uterushorn am Übergang zur Cervix durchtrennt und das Endstück in eine Petrischale gelegt. Nach Einführen einer stumpfen Kanüle (0,9 x 40 mm) in die Öffnung der Uterushornspitze und Aufsetzen einer 20 ml-Spritze mit Medium wurde das Uterushorn in Richtung Cervix durchspült. Nach Umsetzen der Embryonen in Kulturmedium wurden diese unter einem Stereomikroskop (Wild M 8) bei 50-facher Vergrößerung beurteilt.

3.5 Eukleation fusionierter Zweizellembryonen

3.5.1 Herstellung der Eukleationspipetten

Die Eukleationspipette mit dem Außendurchmesser von 20 bis 28 µm wurde durch Ausziehen von Glaskapillaren an einem Kapillarziehgerät (Typ 'Livingston', Fa. Bachofer) hergestellt. Die Kapillaren waren vor dem Ausziehen zwei mal in Aqua dest. ausgekocht und anschließend in Aceton geschwenkt worden. Nach dem Ausziehen wurden die Spitzen der Glaskapillaren in einem

Winkel von 40° bis 50° an einem Kapillarschleifgerät (Fa. Bachofer) angeschliffen und danach zur Reinigung in 95%iger Schwefelsäure, in drei aufeinanderfolgenden Gefäßen mit Aqua dest. und zum Schluß in reinem Propanol gespült. Mit Hilfe einer De Fonbrune Mikroschmiede wurde an der angeschliffenen Spitze eine zusätzliche Spitze von ca. 2 bis 5 µm ausgezogen. Dies erleichterte bei der Eukleation das Durchdringen der Zona pellucida. Anschließend wurde die Pipettenspitze siliconisiert (Sigmacote^R, Sigma), um die Glasoberfläche zu glätten und das Anhaften von Zellmaterial an der Pipette zu verhindern. Um die Verunreinigung der Eukleationspipetten durch Staubpartikel zu vermeiden, wurden diese in einem verschlossenen Behälter aufbewahrt.

3.5.2 Embryonenvorbereitung

Ein Teil der fusionierten Zweizellembryonen der Maus wurden in Kulturmedium mit dem Zusatz von 7,5 µg/ml Cytochalasin D gesetzt. Cytochalasin D hat wie Cytochalasin B die Eigenschaft, die Organisation kontraktile Filamente des Cytoskelltes aufzulösen, zeigt jedoch geringere zytotoxische Eigenschaften (ILLMENSEE, 1987). Die Zellmembranen werden auf diese Weise nachgiebig und extrem dehnbar, was die Eukleation erleichtert. Die Embryonen wurden zwischen 15 und 45 Minuten in Cytochalasin D-haltigem Medium kultiviert und unmittelbar danach enukleiert.

3.5.3 Eukleationsversuche

Auf ein inverses Mikroskop (Wilovert^R, Will) wurde ein Glasobjektträger gelegt und mit einem Tropfen (0,4 ml) Kulturmedium mit 7,5 µg/ml Cytochalasin D bedeckt. Zwei Mikromanipulatoren standen zur Verfügung. Auf der linken Seite des Mikroskopes befand sich ein mechanischer Manipulator (Fa. Bachofer), in dem die Haltepipette zur Fixation der Embryonen

befestigt war. Die von Hand ausgezogene Haltepipette hatte an ihrer Spitze einen Außendurchmesser von 200 μm und einen Innendurchmesser von 40 μm . Sie war an ihrem Ende über einen Schlauch mit einem Mundstück verbunden, über das durch Ein-saugen oder Ausblasen von Luft die Fixation der Embryonen ermöglicht wurde. Rechts des Mikroskopes befand sich ein Leitz-Mikromanipulator, auf dem die Eukleationspipette fixiert war (Abb. 6).

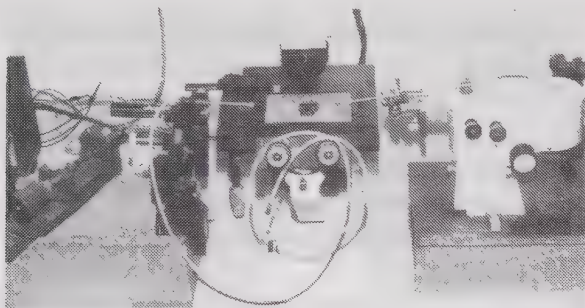


Abbildung 6: Geräteaufbau für die Eukleation
links Mikromanipulator mit Haltepipette; rechts Mikromanipulator mit Eukleationspipette und angeschlossenem, Bayol^R-befülltem Schlauchsystem

Die Eukleationspipette war an ein mit Bayol^R (Sigma) luftfrei befülltes Schlauchsystem angeschlossen, dessen Druck über eine Hamiltonspritze (50 μl) reguliert werden konnte. Dies ermöglichte feinste Sog- und Druckregulierungen. Die Pipettenspitze wurde durch Sog mit etwa 5 μl Medium befüllt, um direkten Kontakt der Embryonen mit Bayol^R zu vermeiden.

Eine Gruppe von 8 bis 15 Embryonen wurde mit Hilfe eines Transferpeltors in den Mediumtropfen auf dem Objektträger überführt. Bei 320 -facher Vergrößerung wurden die Halte- und

Enukleationspipette in die selbe Schärfeebene wie die Embryonen gebracht.

Die Enukleation erfolgte nach dem von McGRATH und SOLTER (1983a; 1983b) beschriebenen Verfahren: ein fusionierter Zweizellembryo wurde mit der Haltepipette so fixiert, daß einer der beiden Zellkerne auf der rechten Seite des Embryos zu liegen kam (Abb. 7). Mit der Enukleationspipette wurde nun schräg in die Zona pellucida eingestochen, so daß deren Spitze im perivitellinen Raum zu liegen kam. Das Ende der Enukleationspipette wurde flach an den Bereich der Zellmembran angelegt, an dem einer der Zellkerne lag. Durch leichten Unterdruck wurde die Zellmembran mit etwas Zytoplasma und einem Zellkern in die Enukleationspipette eingesogen. Sobald sich der Zellkern in der Enukleationspipette befand, wurde diese gleichmäßig zurückgezogen. Auf diese Weise bildete sich eine lange und immer schmäler werdende Zytoplasmabrücke, in der schließlich Zellmembran auf Zellmembran zu liegen kam.

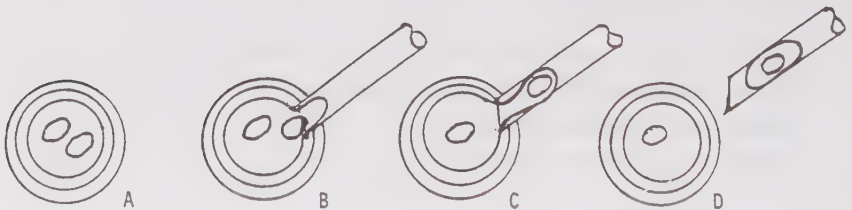


Abbildung 7: Enukleation fusionierter Zweizeller nach dem Prinzip von McGRATH und SOLTER (1983a; 1983b)

(A) Fusionierter Zweizeller; (B) Vorschieben der Spitze der Enukleationspipette in den perivitellinen Raum; (C) Ansaugen der Zellmembran und eines Zellkernes; (D) Nach Abreißen der Zytoplasmabrücke; links fusionierter partiell enukleierter Zweizeller, rechts Karyoplast in der Enukleationspipette.

Durch weiteren Zug wurde das Abreißen der Brücke bewirkt. Da vorher bereits Zellmembran auf Zellmembran zu liegen gekommen war, floß kein Zytoplasma aus.

In der Eukleationspipette befand sich der Karyoplast, bestehend aus einem in wenig Zytoplasma befindlichen Zellkern, der von einer intakten Zellmembran umgeben war. Die Zellmembran des fusionierten und enukleierten Zweizellembryos war ebenfalls geschlossen und intakt. Alle in der Gruppe eingesetzten Embryonen wurden auf diese Weise enukleiert und danach wieder in Kulturmedium ohne Cytochalasin D gesetzt. Innerhalb von 30 Minuten war der Effekt des Cytochalasin D abgeklungen.

Die fusionierten und partiell (1 Kern) enukleierten Zweizellembryonen wurden kultiviert und nach einer Stunde unter einem Stereomikroskop (Wild M 8) bei 50-facher Vergrößerung beurteilt. Embryonen ohne Degenerationserscheinungen wurden (Kapitel 3.3 und 3.4) *in vitro* oder *in vivo* kultiviert.

3.6 Untersuchung geborener Jungtiere

3.6.1 Probenaufbereitung

Kaninchen, die aus Transfers von diploid-tetraploid-Mosaiken geboren wurden, wurden im Alter von 5 bis 6 Monaten nach Betäubung schlachtgetötet. Nach Eröffnung der Bauch- und Brusthöhle wurden folgende Organe entnommen und in PBS überführt: Milz, Leber, Nieren, Nebennieren, Lunge, Knochenmark, Magenschleimhaut der Pars proventricularis, Gonaden (beide Hoden bei männlichen Tieren, beide Ovarien bei weiblichen Tieren). Zur Gewinnung des Knochenmarks wurde der Femur einer Hintergliedmaße 2 bis 3 cm vom distalen Ende abgesetzt. Mit Hilfe einer in die Markhöhle vorgeschobenen Kanüle mit aufgesetzter Spritze wurde PBS in die Markhöhle gespritzt und das herausgeschwemmte Knochenmark in einem Glasgefäß aufgefangen. Alle

Organe wurden mit der Schere in Stückchen von ca. 5 x 5 mm geschnitten. Organproben, Magenschleimhaut und Knochenmark wurden mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein Sieb (Maschenweite 0,6-0,8 mm) in PBS gerieben. Jeweils 50 ml der Zellsuspensionen wurden in Zentrifugengläser überführt und 5 Minuten stehengelassen. Anschließend wurden 13 ml jedes Überstandes in frische Zentrifugengläser überführt. Durch diese Vorgehensweise wurden vornehmlich isolierte Zellen gewonnen, da sich zusammenhängende Zellen oder größere Gewebestückchen durch schnelleres Absinken am Boden der Gläser angesammelt hatten. Nach zehnminütiger Zentrifugation der Zellsuspensionen bei 250 g wurde der Überstand abgegossen und die Zellpellets mit 5 ml Lysing-Reagenz (8,26 g NH_4Cl + 1,09 g NaHCO_3 + 0,0037 g EDTA gelöst in 1 l Aqua dest.) aufgeschwemmt. Nach kräftigem Suspendieren wurden die Zellsuspensionen 10 Minuten bei Zimmertemperatur stehengelassen. Innerhalb dieser Zeit lysierten die Erythrozyten. Die Suspensionen wurden anschließend jeweils mit 8 ml PBS aufgeschwemmt und 10 Minuten bei 250 g zentrifugiert. Nach Abgießen der Überstände wurden die Zellpellets mit 10 ml PBS aufgeschwemmt und die Zellen kräftig suspendiert.

Mit einer Zählkammer nach NEUBAUER wurde die Zelldichte der Suspensionen bestimmt. Gleichzeitig wurde kontrolliert, daß keine Zellaggregate mehr vorhanden waren und die Zellen einzeln suspendiert vorlagen. Jeweils 1,5 Mio Zellen jeder Organprobe wurden in Kryoröhrchen (Fa. Nunc) überführt und 10 Minuten bei 250 g zentrifugiert. Die Überstände wurden abgegossen und jedes Zellpellet wurde mit 1,5 ml TiefgefrieremEDIUM (MEM mit 20 % FKS und 10 % DMSO) resuspendiert. Mit Hilfe eines Einfrierprogrammes wurden die Zellsuspensionen in einem Einfriergerät (Biocool, Fa. FTS-Systems) auf -30°C abgekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Die eingefrorenen Zellen stellten eine Reserve dar.

Der Rest der Zellsuspensionen wurde erneut 10 Minuten bei 250g zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde jedes

Zellpellet mit 5 ml Paraformaldehyd überschichtet und resuspendiert. Auf diese Weise waren die Zellen fixiert und konnten im Kühlschrank bis zum Meßbeginn aufbewahrt werden.

3.6.2 DNA-Messung

Der DNA-Gehalt der Zellen wurde mittels DNA-Fluoreszenz-Messungen mit Hilfe eines Cytofluorometers (EPICS 753) bestimmt. Jeweils 200 µl der Zellsuspensionen wurden durch ein Sieb mit der Maschenweite von 50 µm gespült, mit 800 µl Paraformaldehyd verdünnt und mit 100 I.U. RNase (Sigma) versetzt. Die RNase spaltet die RNA der Zellen und verhindert auf diese Weise Wechselwirkungen der RNA mit dem später zugesetzten Farbstoff und damit Verfälschungen der Meßergebnisse. Zur spezifischen DNA-Anfärbung wurden pro Zellsuspension 10 µl einer 0,01%igen Propidiumiodidlösung (Sigma) zugegeben. Propidiumiodid lagert sich zwischen die beiden Stränge der DNA-Doppelhelix ein. Sein Exzitationsspektrum liegt im UV- bis Gelbbereich, seine Emission im Orangerotbereich. Frühestens 15 Minuten und spätestens 2 Stunden nach der Anfärbung wurden die Proben gemessen, da sonst die Fluoreszenz noch nicht bzw. nicht mehr meßbar war. Die Fluoreszenz von 20 000 einzelnen Zellen jedes Organes wurde gemessen, aufgezeichnet und ausgewertet.

4. ERGEBNISSE

4.1 ZWEIZELLEMBRYONEN

4.1.1 Maus

4.1.1.1 Elektrofusion

Bei der Elektrofusion von Zweizellembryonen zur Erstellung tetraploider Embryonen wurden die Auswirkungen der Superovulation, der Verwendung verschiedener Embryonenmedien vor und nach Auslösung der Fusionspulse auf das Fusionsergebnis sowie der Einfluß der Dielektrophoresebedingungen (Alignmentdauer und Duty Cycle) auf das Fusionsergebnis untersucht. Durch Variation von Pulsanzahl, Pulsdauer und Pulsstärke wurde versucht, optimale Fusionsparameter zu finden.

4.1.1.1.1 Einfluß der Superovulation

Bei der Maus wurden Zweizellembryonen von superovulierten Spendern und von unbehandelten Spendern gewonnen. 416 Zweizellembryonen aus superovulierten Spendern und 92 Zweizellembryonen aus Normalanpaarung wurden denselben Fusionsbedingungen ausgesetzt.

TAB. 8: Einfluß der Superovulation auf das Fusionsergebnis
Fusionsparameter: 2 Pulse je 70 μ s, 0,60-0,69 kV/cm

Super- ovulation	n	fus.	%	nicht		deg.	%
				fus.	%		
ja	416	352	85	62	15	2	0
nein	92	81	88	11	12	0	0

Verwendet wurden je 2 Gleichstimpulse mit der Dauer von 70 μ s und der Stärke von 0,60 bis 0,69 kV/cm. Die Fusionsergebnisse von Zweizellembryonen aus Superovulation und Normalanpaarung sind in Tabelle 8 zusammengestellt.

Während 85 % der Zweizeller aus Superovulation fusionierten, waren es bei Zweizellembryonen aus normal angepaarten Spendertieren 88 %. Im χ^2 -Test unterschieden sich die Fusionsergebnisse von Embryonen aus Superovulation und Normalanpaarung nicht signifikant. Die Degenerationsrate beider Gruppen lag bei 0 %.

4.1.1.1.2 Einfluß der Alignmentdauer

Die Dauer des einwirkenden Wechselstromfeldes vor Auslösung der Fusionspulse war abhängig von der räumlichen Orientierung der Zweizellembryonen, da die vollständige Drehung der Zweizeller durch das Alignment abgewartet wurde. Die Fusionspulse wurden erst ausgelöst, wenn alle Zweizeller mit ihrer Teilungsfurche senkrecht zu den elektrischen Feldlinien und demnach parallel zu den Elektroden standen. Auf diese Weise kamen Alignmentzeiten von unter 10 Sekunden bis zu 90 Sekunden zustande. In Tabelle 9 sind die Fusionsraten von Mäusezweizellembryonen in Abhängigkeit von der Dauer des Alignments aufgelistet.

Die Fusionsrate von Embryonen, die weniger als 10 Sekunden dem Wechselfeld ausgesetzt waren, war jeweils signifikant höher ($p < 0,001$) als die Fusionsrate von Embryonen, deren Alignment 10 bis 20 oder mehr als 20 Sekunden angedauert hatte. Kein statistisch signifikanter Unterschied bestand zwischen den Fusionsraten von Embryonen, deren Alignment 10 bis 20 Sekunden und mehr als 20 Sekunden angedauert hatte.

Die Degenerationsrate von Embryonen, die über 20 Sekunden dem Wechselfeld ausgesetzt waren, war signifikant ($p < 0,001$) grö-

ber als die Degenerationsraten der Zweizeller, die weniger als 20 Sekunden dem Alignment ausgesetzt waren.

TAB. 9: Einfluß der Alignmentdauer auf das Fusionsergebnis von Mäusezweizellembryonen

Alignment- dauer (s)	n	fus.	%	nicht fus.	%	deg.	%
< 10	576	517	90 ^a	37	6	22	4 ^d
10-20	2804	2069	74 ^b	590	21	145	5 ^e
> 20	25	14	56 ^c	5	20	6	24 ^f

a:b = $p < 0,001^*$ d:f = $p < 0,001$ *Auswertung mit dem χ^2 -Test
 a:c = $p < 0,001$ e:f = $p < 0,001$

Die geringe Anzahl von Zweizellembryonen, die länger als 20 Sekunden dem Wechselstromfeld ausgesetzt wurden, ergibt sich aus deren erhöhter Degenerationsrate. Bei einer Alignmentdauer über 60 Sekunden degenerierten alle Embryonen. Als Konsequenz daraus wurden die Embryonen in den folgenden Versuchen nur möglichst kurze Zeit dem Wechselstromfeld ausgesetzt.

4.1.1.1.3 Einfluß des Duty cycle

Zur weiteren Untersuchung des Einflusses des Wechselstromfeldes auf das Fusionsergebnis wurde die Verteilung von an- und ausgeschaltetem Wechselstromfeld während des Alignments variiert. Um eventuell vorhandene Unterschiede deutlicher hervorheben zu können, wurde einerseits ein Duty cycle von 2 % gewählt, bei dem das Wechselstromfeld in jeder 20-Millisekunden-Periode des Alignments nur 0,4 Millisekunden (2 %) angeschaltet ist. Ein Duty cycle von 100 % ließ andererseits das

Wechselstromfeld während der gesamten 20-Millisekunden-Perioden des Alignments einwirken. Der Fusionsverlauf von Mäuseembryonen bei Variation des Duty cycle ist in Tabelle 10 dargestellt.

TAB. 10: Einfluß des Duty cycle auf das Fusionsergebnis bei Mäusezweizellenembryonen

Duty cycle	n	fus.	%	nicht		deg.	%
				fus.	%		
2%	1099	570	52 ^a	418	38	111	10 ^c
100%	3533	2678	76 ^b	657	18	198	6 ^d

a:b = $p < 0,001$ *

*Auswertung mit dem χ^2 -Test

c:d = $p < 0,001$

Die Steigerung des Duty cycle von 2 % auf 100 % brachte eine hoch signifikante Steigerung ($p < 0,001$) der Fusionsausbeute mit sich. Der Anteil degenerierter Embryonen nahm bei Steigerung des Duty cycle von 2 % auf 100 % signifikant ($p < 0,001$) ab.

4.1.1.1.4 Einfluß der Verwendung verschiedener Kulturmedien vor und nach der Fusionsauslösung

Um die Eignung verschiedener Embryonenkulturmedien im Zusammenhang mit der Elektrofusion von Zweizellenembryonen zu untersuchen, wurden verschiedene Kombinationen aus Kulturmedien eingesetzt. Bei Mäuseembryonen wurden modifiziertes Whitten-Medium, M 2 und PBS + 20 % FKS verwendet.

In den Medien, die vor der Fusion eingesetzt wurden, wurden die Embryonen von ihrer Gewinnung aus dem Spendertier bis zum

Waschen in Mammalian Cell Fusion Medium^R unmittelbar vor Einbringung in die Fusionskammer aufbewahrt. Nach Auslösung der Fusionspulse wurden die Embryonen im entsprechenden Kulturmedium gewaschen und in diesem bis zur Beurteilung des Fusionsergebnisses belassen.

Die Tabelle 11 stellt die Fusionsergebnisse bei Verwendung verschiedener Medien vor und nach Fusionsauslösung bei Mäuseembryonen dar.

TAB. 11: Einfluß der Verwendung verschiedener Kulturmedien vor und nach Fusionsauslösung auf das Fusionsergebnis bei Mäusezweizellern

Medium vor/nach*	n	fus.	%	nicht fus.	%	deg.	%
W / W	1686	1380	82 ^a	164	10	142	8 ^f
M 2 / W	769	552	72 ^b	186	24	31	4 ^g
M 2 / M 2	996	652	65 ^c	325	33	19	2 ^h
P / P	704	404	57,5 ^d	228	32,5	72	10
P / W	436	241	55	153	35	42	10

a:b = $p < 0,001$ [#] h:g = $p < 0,05$

b:c = $p < 0,01$ g:f = $p < 0,001$

c:d = $p < 0,001$ h:f = $p < 0,001$

* W : Whitten-Medium

P : PBS + 20 % FKS

[#]Auswertung mit dem χ^2 -Test

Bei Verwendung von modifiziertem Whitten-Medium vor und nach Auslösung der Fusionspulse wurden mit 82 % fusionierten Embryonen signifikant höhere Fusionsraten ($p < 0,001$) erzielt als bei allen anderen Medienkombinationen. Die Verwendung von M 2 vor und Whitten-Medium nach der Fusionsauslösung brachte signifikant höhere Fusionsraten ($p < 0,01$) als die alleinige Verwendung von M 2. Die wenigsten Zweizellembryonen (55 %) fu-

sionierten bei Verwendung von PBS + 20 % FKS vor den Fusionspulsen und Whitten-Medium nach den Fusionspulsen sowie bei Gebrauch von PBS + 20 % FKS vor und nach der Fusionsauslösung (57,5 %).

Die Degenerationsrate war bei Verwendung von M 2 vor und nach der Fusionsauslösung mit 2 % signifikant ($p < 0,05$) kleiner als bei Verwendung von M 2 in Kombination mit Whitten-Medium (4%) und signifikant kleiner ($p < 0,001$) als bei alleiniger Verwendung von Whitten-Medium (8 %).

Kein signifikanter Unterschied bestand zwischen den Degenerationsraten bei Verwendung von Whitten-Medium vor und nach Fusionsauslösung (8 %) und bei alleiniger Verwendung von PBS + 20 % FKS (10 %) und PBS + 20 % FKS in Kombination mit Whitten-Medium (10 %).

4.1.1.1.5 Einfluß der Pulsanzahl

Die Anzahl der Gleichstrompulse für Fusionszwecke wurde bei Mäusezweizellembryonen von 1 bis 9 Pulsen variiert.

Die höchste Fusionsrate mit 84 % wurde bei Verwendung von 4 Fusionspulsen erzielt, unterschied sich jedoch im χ^2 -Test nicht signifikant von den Fusionsraten bei Verwendung von einem Fusionspuls und Verwendung von 3 Fusionspulsen, bei der 81 % bzw. 79 % der Zweizeller fusionierten (Tab. 12).

Mit steigender Pulsanzahl nahm die Rate degenerierender Embryonen zu. Bei Verwendung von einem oder zwei Fusionspulsen degenerierten 3 % der Embryonen, bei 3 Fusionspulsen degenerierten mit 6 % signifikant mehr ($p < 0,001$) Embryonen. Die Steigerung der Anzahl der Fusionspulse von 3 auf 4 führte zu keiner signifikanten Steigerung der Degenerationsrate. Bei Steigerung von 3 auf 5 Fusionspulse jedoch degenerierten mit

10 % signifikant mehr ($p < 0,05$) Embryonen und bei Anwendung von 6 Pulsen degenerierten 17 % aller Embryonen.

TAB. 12: Einfluß der Variation der Pulsanzahl auf das Fusionsergebnis von Mäusezweizellembryonen

Puls- anzahl	n	fus.	%	nicht fus.	%	deg.	%
1	787	636	81	129	16	22	3 ^a
2	1668	1221	73	405	24	42	3 ^b
3	468	368	79	72	15	28	6 ^c
4	331	279	84	20	6	32	10 ^d
5	696	347	50	277	40	72	10 ^e
6	402	251	62	84	21	67	17 ^f

a:c = $p < 0,01^*$ d:f = $p < 0,01$ *Auswertung mit dem χ^2 -Test
 b:c = $p < 0,001$ e:f = $p < 0,01$
 c:e = $p < 0,05$

Die Steigerung der Pulsanzahl auf 7, 8 und 9 brachte Reduktionen der Fusionsraten auf 29 % und Steigerungen der Degenerationsraten bis auf 23 % mit sich.

4.1.1.1.6 Einfluß der Pulsdauer

Um den Einfluß der Pulsdauer auf das Fusionsergebnis von Zweizellembryonen untersuchen zu können, wurden bei der Maus Gleichstrompulse von 30 μ s bis zu 90 μ s verwendet.

Pulse von kurzer Dauer brachten geringe Fusionsraten mit sich. Bei der Verwendung von 30 μ s-Pulsen fusionierten nur 15% (11/74) der Zweizeller.

Die Fusionsrate bei Pulsen der Dauer 70 μ s war signifikant größer ($p < 0,001$) als bei Pulsen mit 80 und 90 μ s (Tab. 13). Signifikant weniger ($p < 0,01$) Embryonen degenerierten bei Pulsen der Dauer 70 μ s gegenüber Pulsen der Dauer 80 μ s. Die Degenerationsraten bei Verwendung von Pulsen mit 70 und 90 μ s Dauer hingegen unterschieden sich nicht signifikant. Dagegen war die Degenerationsrate bei Pulsen der Dauer 90 μ s signifikant kleiner ($p < 0,001$) als bei Pulsen der Dauer 80 μ s.

TAB. 13: Einfluß der Pulsdauer auf das Fusionsergebnis bei Mäusezweizellembryonen

Puls- dauer (μ s)	n			nicht			
		fus.	%	fus.	%	deg.	%
60	157	140	89 ^a	8	5	9	6
70	2529	1908	75 ^b	476	19	145	6 ^e
80	1020	642	63 ^c	293	29	85	8 ^f
90	573	361	63 ^d	190	33	22	4 ^g

a:b = $p < 0,001^*$ e:f = $p < 0,01$ *Auswertungen mit dem χ^2 -Test
 b:c = $p < 0,001$ f:g = $p < 0,001$
 b:d = $p < 0,001$

Die maximale Fusionsrate von 89 % (140/157) wurde durch Verwendung von Pulsen der Dauer 60 μ s erreicht. Sie war signifikant größer ($p < 0,001$) als die Fusionsrate bei Pulsen der Dauer von 70 μ s. Bei Verwendung dieser Pulslänge degenerierten 6 % (9/157) der Embryonen. Die Degenerationsrate unterschied sich nicht signifikant von der Degenerationsrate bei Pulsen der Dauer 70 μ s.

4.1.1.1.7 Einfluß der Pulsstärke

Die Stärke der Gleichstropmpulse für die Elektrofusion wurde über die angelegte Feldspannung reguliert. Bei Mäuseembryonen wurde die Feldspannung von 0,30 bis 1,79 kV/cm variiert. In Tabelle 14 sind die Fusionsergebnisse von Mäusezweizellern bei Variation der Feldspannung von 0,50 bis 1,09 kV/cm zusammengestellt.

Bei Erhöhung der Feldspannung von 0,50-0,59 auf 0,60-0,69 kV/cm steigerte sich die Fusionsrate der Embryonen signifikant ($p < 0,001$) von 74 % auf 86 % (Tab. 14). Gleichzeitig nahm die Degenerationsrate signifikant ($p < 0,001$) von 5 % auf 1 % ab. Bei weiterer Erhöhung der Feldstärke auf 0,70-0,79 kV/cm jedoch nahm die Fusionsrate signifikant ($p < 0,001$) ab und die Degenerationsrate signifikant ($p < 0,01$) zu. Die Fusionsraten bei 0,70-0,79 und 0,80-0,89 kV/cm waren mit 71 % gleich groß.

TAB. 14: Einfluß der Pulsstärke auf das Fusionsergebnis bei Mäusezweizellembryonen

Feldspannung (kV/cm)	n	fus.	%	nicht		deg.	%
				fus.	%		
0,50 - 0,59	388	286	74 ^a	83	21	19	5 ^g
0,60 - 0,69	1116	964	86 ^b	140	13	12	1 ^h
0,70 - 0,79	851	605	71 ^c	221	26	25	3 ⁱ
0,80 - 0,89	999	704	71 ^d	183	18	112	11 ^k
0,90 - 0,99	520	277	53 ^e	219	42	24	5 ^l
1,00 - 1,09	311	156	50	108	35	47	15 ^m

a:b = $p < 0,001$ *

g:h = $p < 0,001$

*Auswertung mit dem χ^2 -Test

b:c = $p < 0,001$

h:i = $p < 0,01$

c:e = $p < 0,001$

i:k = $p < 0,001$

d:e = $p < 0,001$

k:l = $p < 0,001$

l:m = $p < 0,001$

Signifikant weniger ($p < 0,001$) Embryonen fusionierten bei einer weiteren Erhöhung der Feldspannung auf 0,90-0,99 kV/cm. Die Degenerationsrate von 15 % bei Verwendung einer Feldstärke von 1,00-1,09 kV/cm war signifikant größer ($p < 0,001$) als die Degenerationsrate bei 0,90-0,99 kV/cm (5 %), unterschied sich jedoch nicht signifikant von der Degenerationsrate bei 0,80-0,89 kV/cm (11 %).

Bei einer Feldspannung von 1,30-1,39 kV/cm fusionierten nur noch 29 % (8/28) der Embryonen und 50 % der Embryonen (14/28) degenerierten.

4.1.1.1.8 Einfluß verschiedener Kombinationen aus Pulsanzahl, Pulsdauer und Pulsstärke

Verschiedene Kombinationen von Pulsanzahl, Pulsdauer und Pulsstärke wurden ausgetestet und deren Einfluß auf das Fusionsergebnis untersucht.

Bei Pulsstärken von 0,60-0,89 kV/cm war die Fusionsrate bei einem und zwei Pulsen bei einer Pulsdauer von 70 μ s am größten, unterschied sich jedoch in beiden Fällen nicht signifikant von den Fusionsraten bei Pulsdauern von 80 μ s (Tab. 15). Pulsdauern von 90 μ s dagegen führten zu signifikant ($p < 0,001$) niedrigeren Fusionsraten. Lange Pulsdauern brachten bei Verwendung eines Fusionspulses keine signifikant erhöhten Degenerationsraten der Embryonen mit sich. Bei Verwendung von zwei Fusionspulsen jedoch stieg die Degenerationsrate bei Verlängerung der Pulsdauer von 70 auf 80 μ s signifikant ($p < 0,01$) an.

TAB. 15: Fusionsergebnisse von Mäusezweizellembryonen bei Variation von Pulsanzahl, Pulsstärke und Pulsdauer

Pulskombination										
PA	PS	PD	nicht							
	(kV/cm)	(μ s)	n	fus.	%	fus.	%	deg.	%	
1	0,60-0,89	70	73	69	95 ^a	4	5	0	0	
		80	234	208	89	23	10	3	1	
		90	467	347	74 ^b	101	22	19	4	
2	0,30-0,59	70	150	104	69	46	31	0	0	
		50	34	19	56 ^c	14	41	1	3	
	0,60-0,89	70	1088	925	85 ^d	154	14	9	1 ^f	
		80	47	35	75	9	19	3	6 ^g	
		90	106	14	13 ^e	89	84	3	3	
	0,90-1,19	70	242	123	51	93	38	26	11	
3	0,30-0,59	70	189	159	84	11	6	19	10	
	0,60-0,89	70	279	209	75	61	22	9	3	
4	0,30-0,59	70	30	26	87	4	13	0	0	
	0,60-0,89	70	138	109	79	5	4	24	17	
5	0,60-0,89	70	68	26	38	19	28	23	34	
	0,90-1,19	70	188	126	67	51	27	11	6	

a:b = $p < 0,001$ *

f:g = $p < 0,01$

*Auswertung mit dem χ^2 -Test

c:d = $p < 0,001$

PA: Pulsanzahl

d:e = $p < 0,001$

PS: Pulsstärke

PD: Pulsdauer



Abbildung 8: Mäusezweizeller vor der Fusion

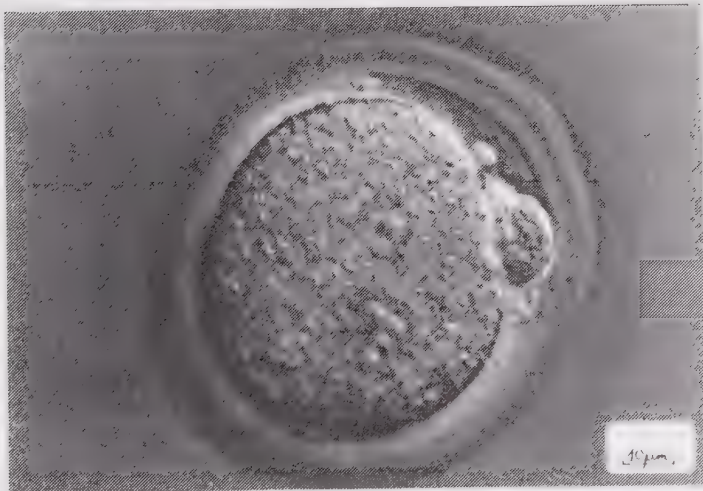


Abbildung 9: Fusionierter Mäusezweizeller

4.1.1.2 In vitro Kultur fusionierter Zweizellembryonen

Um die Entwicklungsfähigkeit fusionierter Zweizellembryonen untersuchen zu können, wurde ein Teil der fusionierten Zweizeller in vitro kultiviert. Unbehandelte Zweizellembryonen wurden als Kontrollen den selben Kulturbedingungen unterzogen.

TAB. 16: Ergebnisse der in vitro Kulturen von fusionierten Mäusezweizellern in Whitten-Medium

Art der Embryonen	n	nicht		davon geteilt zu			
		geteilt	geteilt	ZZ	DZ+VZ	SZ+AZ	M+B
fus. ZZ	522	297	225 ^a	88 ^e	34	4	99 ^c
	(%) [*]	57	43	17	6	1	19
	(%) ^{**}			39	15	2	44
Kontrollen	182	60	122 ^b	0	56 ^f	10	56 ^d
	(%) [*]	33	67	0	31	5	31
	(%) ^{**}			0	46	8	46

a:b = $p < 0,001$ [#]

c:d = $p < 0,01$

e:f = $p < 0,001$

*: % bezogen auf die Gesamtzahl n

** : % bezogen auf die geteilten Embryonen

[#]Auswertung mit dem χ^2 -Test

Die Kultivierung der Mäuseembryonen erfolgte in modifiziertem Whitten-Medium.

43 % der fusionierten und 67 % der Kontrollzweizeller teilten sich in vitro weiter (Tab. 16). Im χ^2 -Test erwies sich die Teilungsrate der Kontrollembryonen als signifikant größer ($p < 0,001$) als die der fusionierten Zweizellembryonen. Unter Berücksichtigung der zweiten Zellteilung jeder Gruppe war festzustellen, daß mit 17 % aller in vitro kultivierten fu-

sionierten Embryonen signifikant ($p < 0,001$) weniger die zweite Zellteilung vollzogen, als dies bei den Kontrollen mit 31% im Drei- bis Vierzellstadium der Fall war. In bezug auf die geteilten Embryonen entsprach dies 39 bzw. 46 %. Zum Morula- und Blastozystenstadium entwickelten sich mit 19 % aller in vitro kultivierten fusionierten Zweizeller signifikant weniger ($p < 0,01$) als bei den in vitro kultivierten Kontrollembrionen mit 31 %. Bezüglich der geteilten Embryonen unterschieden sich die Teilungsraten mit 44 % bzw. 46 % jedoch nur gering.

In Tabelle 17 sind die Ergebnisse der in vitro Kultur von fusionierten Zweizellembryonen unter Berücksichtigung der Anzahl der verwendeten Fusionspulse aufgelistet.

Die Teilungsraten fusionierter Zweizeller unterschieden sich nicht signifikant, wenn die Fusion von einem oder zwei Pulsen ausgelöst wurde (33 bzw. 41 %). Bei Steigerung der Pulsanzahl von zwei auf drei jedoch war eine signifikant höhere ($p < 0,01$) Teilungsrate zu verzeichnen (66 %). Die Verwendung von fünf Fusionspulsen brachte gegenüber drei Fusionspulsen eine signifikant schlechtere Teilungsrate ($p < 0,001$) von 29 % mit sich.

Mit Steigerung der Pulsanzahl von 1 bis 3 verbesserte sich die Entwicklungsfähigkeit der fusionierten Embryonen zu Morulae oder Blastozysten signifikant ($p < 0,001$) von 18 % über 20% auf 37 %. Von Zweizellern, die mit Hilfe von fünf Pulsen fusioniert wurden, entwickelten sich signifikant weniger ($p < 0,001$) bis zum Morula- oder Blastozystenstadium als von Zweizellern, die mit drei Pulsen fusioniert wurden. Diese Tendenz zeigt sich ebenfalls bei Betrachtung der Entwicklungsraten von sich teilenden Embryonen. Während sich nach Kultur der mit 1, 2 oder 3 Pulsen fusionierten Embryonen 55, 50 und 57 % zu Morulae oder Blastozysten entwickelt hatten, so waren es bei Verwendung von 5 Fusionspulsen nur noch 14 %.

TAB. 17: Ergebnisse der in vitro Kultur von fusionierten
Zweizellembryonen der Maus in Whitten-Medium unter
Berücksichtigung der Anzahl verwendeter Fusionspulse

Puls- anzahl	n	nicht		davon geteilt zu			
		geteilt	geteilt	ZZ	DZ+VZ	SZ+AZ	M+B
1	60	40	20 ^a	4	4	1	11 ^d
	(%) [*]	67	33	7	7	1	18
	(%) ^{**}			20	20	5	55
2	64	38	26	12	1	0	13
	(%) [*]	59	41	19	2	0	20
	(%) ^{**}			46	4	0	50
3	67	23	44 ^b	9	9	1	25 ^e
	(%) [*]	34	66	13,5	13,5	2	37
	(%) ^{**}			20,5	20,5	2	57
5	127	90	37 ^c	28	3	1	5 ^f
	(%) [*]	71	29	22	2	1	4
	(%) ^{**}			75	8	3	14

a:b = $p < 0,001$ [#]

b:c = $p < 0,001$

d:e = $p < 0,05$

e:f = $p < 0,001$

d:f = $p < 0,01$

*: % bezogen auf die Gesamtzahl n

** : % bezogen auf die geteilten Embryonen

[#]Auswertung mit dem χ^2 -Test

4.1.1.3 In vivo Kultur fusionierter Zweizellembryonen

Um die Entwicklung fusionierter Zweizellembryonen in vivo verfolgen zu können, wurden bei der Maus fusionierte Zweizellembryonen in pseudogravide Empfängertiere transferiert. Die transferierten Embryonen wurden nach 2 bis 4 Tagen durch Spulung der Empfängertiere wiedergewonnen. Zwei Empfängertie-

re wurden am Tag 17 bzw. 19 getötet und auf Vorhandensein von Feten untersucht.

In sieben Transfers wurden 114 fusionierte Zweizellembryonen und 83 Kontrollembryonen übertragen. Jedes Empfängertier erhielt neben fusionierten Zweizellern auch unbehandelte Ein- und Zweizeller als Kontrollen. Bei den beiden in vivo Kulturen über 17 und 19 Tage wurden neben Zweizellern als Kontrollen auch Ein-, Vier- und Achtzeller transferiert.

In einem Empfängertier konnten nach 3 Kulturtagen keine Embryonen wiedergefunden werden. Ebenso waren bei den beiden Empfängertieren mit 17- und 19-tägiger Kulturdauer keine Feten oder Resorptionsstellen zu finden.

Die Ergebnisse der 2- bis 4-tägigen in vivo Kulturen sind in Tabelle 18 zusammengefaßt.

TAB. 18: Zusammenfassung der in vivo Kultur-Ergebnisse von fusionierten Mäusezweizellembryonen bei einer Kulturdauer von 2 bis 4 Tagen

Art der Embr.	Anzahl transf. Embr.	wieder- gefunden gesamt	davon Entwicklungsstadien					
			deg.	EZ	ZZ	DZ+VZ	SZ+AZ	M+B
fus. ZZ	79	34	12	6	2	3	0	11
	(%) *	43	15	8	2	4	0	14
	(%) **		35	18	6	9	0	32
Kontr.	66	30	6	5	2	5	0	12
	(%) *	45	9	7,5	3	7,5	0	18
	(%) **		20	17	6	17	0	40

*: % bezogen auf die transferierten Embryonen

** : % bezogen auf die wiedergefundenen Embryonen

Bezogen auf die transferierten Embryonen entwickelten sich, unter Einbeziehung des Empfängertieres, in dem keine Embryonen wiedergefunden werden konnten, 14 % der fusionierten und 18 % der Kontrollembrionen bis zum Morulae- oder Blastozystenstadium weiter. Die Entwicklungsraten waren im χ^2 -Test nicht signifikant unterschiedlich. Bezüglich der wiedergefundenen Embryonen hatten sich 32 % der fusionierten Zweizeller und 40 % der Kontrollembrionen zu Morulae oder Blastozysten entwickelt. Auch hier war kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den fusionierten und den Kontrollembrionen festzustellen.

Bei acht Empfängertieren wurde nach Transfer von 122 fusionierten und 79 Kontrollembrionen der Geburtstermin abgewartet. 4 von 8 Empfängertieren kamen zur Geburt. Dies entsprach einer Trächtigkeitsrate von 50 %. In den vier Würfen wurde kein Tier aus Fusionsversuchen geboren. Dagegen wurden 21 Kontrolltiere lebend geboren (Tab. 19). Die Überlebensrate

Tab. 19: Transferergebnisse nach Übertragung von fusionierten Embryonen und Kontrollembrionen der Maus

Empf. Nr.	Anzahl transferierter		Empfänger- synchronität		geborene Tiere aus	
	fus.ZZ	Kon.	fus.ZZ/Kon.		fus.ZZ	Kon.
1	4	3 ZZ	sy.	sy.	0	0
2	14	4 ZZ	sy.	sy.	0	0
3	15	14 ZZ	sy.	sy.	0	0
4	18	18 ZZ	sy.	sy.	0	6
5	8	8 EZ	- 24 h	sy.	0	5
6	22	3 VZ, 5 AZ	- 24 h	- 48 h	0	0
7	21	6 SZ, 2 AZ	- 24 h	- 48 h	0	7
8	20	10 VZ, 6 AZ	- 24 h	- 48 h	0	3
Summe	122	79			0	21

der Kontrollembryonen lag somit bei 27 % (21/79), die Überlebensrate in graviden Empfängertieren bei 42 % (21/50).

Kontrollembryonen konnten sich sowohl in synchronen Empfängertieren als auch in Tieren entwickeln, deren Zyklus 48 Stunden hinter den entsprechenden Stadien der Kontrollembryonen zurücklag. Transferierte Ein-, Zwei-, Sechs- und Achtzeller entwickelten sich zu Jungtieren. Ob sich Jungtiere aus transferierten Vierzellembryonen entwickelt hatten war aus den Transferergebnissen nicht ersichtlich.

4.1.2 Kaninchen

4.1.2.1 Elektrofusion

Für die Fusionsversuche wurden ausschließlich Embryonen von superovulierten Spendertieren herangezogen.

Bei Variation der Alignmentdauer zeigte sich, daß Kaninchenzweizeller von über 20 Sekunden andauerndem Alignment nicht in ihrer Lebensfähigkeit beeinflußt werden. Von 28 Embryonen fusionierten 15 (54 %), 14 (46 %) fusionierten nicht, zeigten jedoch keine Degenerationserscheinungen. Aufgrund des kleinen Zahlenmaterials kann keine eindeutige Aussage bezüglich des Einflusses der Alignmentdauer auf das Fusionsergebnis gemacht werden.

Die Steigerung des Duty cycles von 2 % auf 100 % brachte bei Kaninchenzweizellern keine signifikante Steigerung der Fusionsrate mit sich. Die Degenerationsrate nahm mit gesteigertem Duty cycle signifikant von 32 % auf 15 % ab (Tab. 20).

TAB. 20: Einfluß des Duty cycle auf das Fusionsergebnis bei Kaninchenzweizellembryonen

Duty cycle	n	fus.	%	nicht		deg.	%
				fus.	%		
2%	84	29	35	28	33	27	32 ^a
100%	88	36	41	39	44	13	15 ^b

a:b = $p < 0,001^*$

*Auswertung mit dem χ^2 -Test

Um die Eignung verschiedener Kulturmedien im Zusammenhang mit der Elektrofusion zu untersuchen, wurde PBS + 10 % FKS und BSM 2 verwendet.

TAB. 21: Einfluß verschiedener Kulturmedien vor und nach der Fusionsauslösung auf das Fusionsergebnis bei Kaninchenzweizellern

Medium vor/nach* der Fusion	n	fus.	%	nicht		deg.	%
				fus.	%		
B 2 / B 2	133	54	41	56	42	23	17 ^a
P / P	27	6	22	9	33	12	45 ^b

a:b = $p < 0,01^{\#}$

* B 2: Basal Synthetic Medium 2

P: PBS + 10% FKS

[#]Auswertung mit dem χ^2 -Test

Die Fusionsrate bei Einsatz von BSM 2 vor und nach Auslösung der Fusionspulse war mit 41 % deutlich, im χ^2 -Test jedoch nicht signifikant höher als bei dem Einsatz von PBS + 10 % FKS, bei dem 22 % der Zweizellembryonen fusionierten (Tab. 21). Die Degenerationsrate der Embryonen war bei Verwendung

von PBS + 10 % FKS mit 45 % signifikant höher ($p < 0,01$) als bei Verwendung von BSM 2 (17 %).

Die Anzahl der Gleichstrompulse für Fusionszwecke wurde bei Kaninchenembryonen von 2 bis 8 variiert.

Bei Anwendung von zwei Fusionspulsen fusionierte keiner von sechs Zweizellern. Bei vier Fusionspulsen fusionierten 22 (37%) und degenerierten 7 von 60 Embryonen (12 %). Maximale Fusionsraten von 47 % (36/77) wurden durch Verwendung von 7 Fusionspulsen erzielt. Die Anwendung von 7 Pulsen brachte jedoch bereits die Degeneration von 27 % (21/77) der Embryonen mit sich.

Bei Variation der Pulsdauer zwischen 40 und 80 μ s zeigt sich, daß bei der Pulsdauer von 50 μ s 50 % (36/72) der Zweizeller fusionierten und 28 % (20/72) degenerierten. Die Verlängerung der Pulsdauer auf 70 und 80 μ s reduzierte die Fusionsraten auf 33% (22/66) beziehungsweise 30 % (7/23). Die Degenerationsrate von Kaninchenembryonen war mit 39 % (9/23) bei der Pulslänge von 80 μ s am größten.

Die Steigerung der Pulsstärke brachte erhöhte Fusionsraten mit sich. Bei Verwendung einer Feldspannung von 0,60-0,69 kV/cm fusionierten 36 % (25/69) der Kaninchenzweizellembryonen, 45 % dagegen (21/47) bei Steigerung der Feldspannung auf 0,70-0,79 kV/cm. Gleichzeitig stieg jedoch die Degenerationsrate von 9 % (6/69) auf 28 % (13/47) an.

Die Untersuchung des Einflusses verschiedener Kombinationen aus Pulsanzahl, Pulsdauer und Pulsstärke zeigte, daß bei Verwendung von vier Fusionspulsen mit der Dauer von je 70 μ s und der Pulsstärke von 0,60-0,69 kV/cm 24 % (8/34) der Zweizeller fusionierten, bei Steigerung der Pulsstärke auf 0,70-0,79 kV/cm hingegen mit 54 % (14/26) signifikant mehr ($p < 0,05$) Embryonen fusionierten. Bei Anwendung von mehr, aber kürzeren Pulsen nahm die Fusionsrate mit steigender Feldspan-

nung ab. So erbrachten sieben Fusionspulse von je 50 μ s Dauer bei einer Feldspannung von 0,50-0,79 kV/cm eine Fusionsrate von 56 % (28/50), bei einer Feldspannung von 0,80-1,09 kV/cm eine Fusionsrate von 36 % (8/22). Im χ^2 -Test war diese Abnahme jedoch nicht signifikant.

4.1.2.2 In vitro Kultur fusionierter Zweizellembryonen

Als Kulturmedium für Kaninchenembryonen wurde BSM 2 verwendet. Von 17 in vitro kultivierten fusionierten Kaninchenzweizellembryonen teilten sich 9 nicht weiter. Zwei der sich teilenden Embryonen blieben im Zweizellstadium, zwei im Drei- bis Vierzellstadium stehen. Die restlichen vier Embryonen entwickelten sich bis zum Morulastadium weiter. 4 in vitro kultivierte Zweizellkontrollembryonen entwickelten sich ebenfalls zu Morulae.

4.1.2.3 In vivo Kultur fusionierter Zweizellembryonen

Beim Kaninchen wurden 14 fusionierte Zweizeller über drei Tage in vivo kultiviert. Durch Spülung des Empfängertieres konnten 9 der 14 Embryonen (64 %) wiedergefunden werden. Zwei Embryonen waren degeneriert, 4 hatten sich zum Morulastadium und 3 zum Blastozystenstadium (Abb. 10) weiterentwickelt.

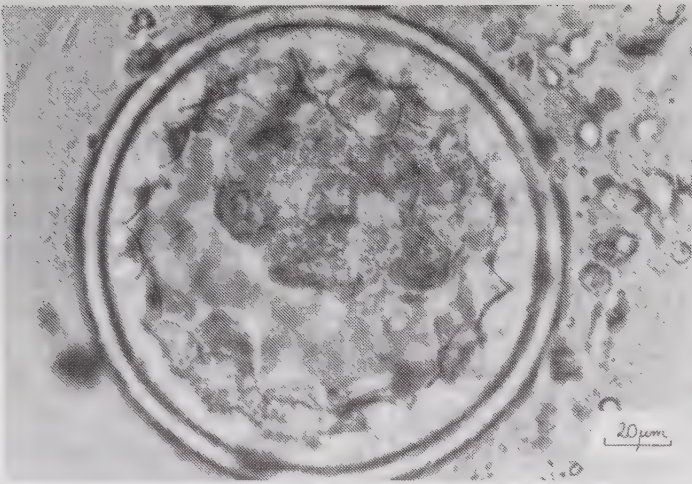


Abb. 10: Tetraploide Blastozyste des Kaninchens;
entwickelt aus einem fusionierten Zweizeller
in dreitägiger in vivo Kultur

4.1.3 Schwein

4.1.3.1 Elektrofusion

Für die Elektrofusion wurden ausschließlich Embryonen aus superovulierten Spendertieren herangezogen, die im Rahmen von Embryotransfer-Programmen beim Schwein gewonnen wurden. Aufgrund des kleinen Zahlenmaterials konnten für Schweinezweizeller nicht alle Dielektrophorese- und Fusionsparameter untersucht werden. Darüberhinaus ließ der geringe Versuchsumfang bei untersuchten Parametern nicht immer eindeutige Aussagen zu.

Tendenziell war festzustellen, daß die Fusionsraten beim Schwein bei Verwendung einer Alignmentdauer von 10 bis 20 Sekunden denen von Mäusen entsprachen. Bei dieser Alignment-

dauer fusionierten 26 von 36 Embryonen. Dies entspricht einer Fusionsrate von 72 %.

Die Fusionsrate lag bei 2 %igem Duty cycle mit 75 % (41/55) höher als bei 100 %igem Duty cycle mit 72 % (26/36). Die Fusionsraten unterschieden sich im χ^2 -Test nicht signifikant voneinander. Die Degenerationsrate der Schweineembryonen verringerte sich mit gesteigertem Duty cycle nicht signifikant von 9 % (5/55) auf 0 % (0/36).

Die Pulsdauer wurde bei der Fusion von Zweizellern von 70 μ s bis 80 μ s variiert.

75 % der Schweinezweizeller (36/48) fusionierten bei Pulslängen von 70 μ s und 72 % (31/43) bei Pulslängen von 80 μ s. Umgekehrt stieg die Degenerationsrate dabei von 4 % (2/48) auf 7 % (3/43) an.

Die Pulsstärke wurde bei Schweineembryonen von 0,70 bis 1,89 kV/cm variiert.

71 % (25/35) der Schweinezweizeller fusionierten bei der Pulsstärke von 0,70-0,79 kV/cm. Keiner der Embryonen degenerierte bei dieser Pulsstärke. Auch bei höheren Pulsstärken zeigten die Zweizeller selten Degenerationserscheinungen. Von 41 Embryonen, die Pulsstärken von 1,00-1,89 kV/cm ausgesetzt waren, fusionierten 33 (80 %) und lediglich 3 (7 %) degenerierten.

Bei verschiedenen Kombinationen von Pulsanzahl, Pulsstärke und Pulsdauer fusionierten 73 % (24/33) der Zweizeller bei Verwendung von zwei Fusionspulsen mit der Pulsdauer von 70 μ s und der Pulsstärke von 0,70-0,79 kV/cm. Es zeigte sich, daß selbst bei vielen Pulsen (6) und langen Pulsdauern (80 μ s) die Fusionsraten der Zweizeller durch Steigerung der Feldspannung erhöht wurden. Bei Pulsstärken von 0,70-1,09 kV/cm fusionierten 7 von 14 Zweizellembryonen, bei Stärken von 1,10

bis 1,49 kV/cm 13 von 17 und bei Stärken von 1,50-1,89 kV/cm 11 von 12 Embryonen.

4.1.3.2 In vitro Kultur fusionierter Zweizellembryonen

Die fusionierten Schweinezweizeller wurden in PBS + 20 % LS kultiviert. Die Ergebnisse der in vitro Kulturen sind in Tabelle 22 dargestellt.

8 von 45 (18 %) kultivierten fusionierten Zweizellern entwickelten sich weiter, davon 7 zu Zweizellern und einer zum Vierzeller. Die Entwicklungsfähigkeit der Kontrollembryonen war dagegen mit 4 geteilten von 9 kultivierten Embryonen besser. Die geteilten Embryonen entwickelten sich bis zum Drei- und Vierzellstadium.

TAB. 22: Ergebnisse der in vitro Kultur von fusionierten Zweizellembryonen des Schweines

Art der Embryonen	n	nicht		davon geteilt zu			
		geteilt	geteilt	ZZ	DZ+VZ	SZ+AZ	M+B
fus. ZZ	45	37	8	7	1	0	0
	(%) *	82	18	16	2	0	0
	(%) **			89	11	0	0
Kontrollen	13	9	4	0	4	0	0

* % bezogen auf die Gesamtzahl n

** % bezogen auf die geteilten Embryonen

4.2 MEHRZELLEMBRYONEN

4.2.1 Maus

4.2.1.1 Elektrofusion

In die Versuche zur Erstellung von diploid-tetraploid-Mosaiken durch Elektrofusion von wenigen Blastomeren innerhalb der Mehrzellembryonen wurden Drei-, Vier- und Achtzeller sowie frühe kompaktierte Morulae einbezogen.

In Tabelle 23 sind die Fusionsergebnisse nach den verschiedenen Mehrzellerstadien aufgeschlüsselt.

Die Fusionsraten waren bei der Fusion von Mäusemehrzellern bei Vierzellembryonen (62 %) signifikant kleiner ($p < 0,001$) als bei Achtzellern (98 %), frühen und kompaktierten Morulae (96 % bzw. 100 %). In gleicher Weise war die Rate entstandener diploid-tetraploid-Mosaik bei den Vierzellembryonen signifikant kleiner ($p < 0,001$) als bei den übrigen Mehrzellembryonen. Die Rate entstandener Mosaik bei der Fusion von Achtzellembryonen war signifikant kleiner als die von kompaktierten Morulae. Dagegen war kein signifikanter Unterschied zwischen den Raten entstandener Mosaik bei der Fusion von Achtzellern (87 %) und kompaktierten Morulae (92 %) festzustellen. Die Rate entstandener diploid-tetraploid-Mosaik war bei der Fusion von kompaktierten Morulae mit 100 % signifikant größer ($p < 0,01$) als bei der Fusion von frühen Morulae mit 92 %. Bei keinem der Mäusemehrzellembryonen war die Fusion unsicher. Mit 21 % degenerierten Embryonen war die Degenerationsrate bei Vierzellern signifikant höher ($p < 0,001$) als bei den Achtzellern (3 %) und den frühen und kompaktierten Morulae (3 % bzw. 0 %).

TAB. 23: Fusionsergebnisse verschiedener Mehrzellstadien von Mäuseembryonen

Mehrzell- stadium	n	fus.	fusioniert zu		Fus.		
			2n/4n- Mosaik	>4n- Embryo	frag- lich	nicht fus.	deg.
VZ	138	86 ^a	34	52	0	23	29
	(%) [*]	62	24/40 ^{**}	38/60 ^{**}	0	17	21
AZ	125	122 ^b	109 ^e	13	0	0	3
	(%) [*]	98	87/89 ^{**}	11/11 ^{**}	0	0	2
FM	89	85 ^c	82 ^f	3	0	1	3
	(%) [*]	96	92/96 ^{**}	3,5/ 4 ^{**}	0	1	3,5
KM	80	80 ^d	80 ^g	0	0	0	0
	(%) [*]	100	100/100 ^{**}	0/ 0 ^{**}	0	0	0

a:b = p<0,001# # Auswertung mit dem χ^2 -Test

a:c = p<0,001 * % bezogen auf die Gesamtzahl n

a:d = p<0,001 ** % bezogen auf die fusionierten Mehrzell-
embryonen

e:g = p<0,001

f:g = p<0,01 2n/4n-Mosaik: diploid-tetraploid-Mosaik

>4n-Embryo : Mehrzeller, bei dem mehr als
zwei Blastomeren miteinander fusioniert sind

Bei Zusammenfassung der Fusionsergebnisse von Drei-, Vier- und Achtzellern sowie frühen und kompaktierten Morulae ergab sich eine Fusionsrate von 84 % (Tab. 24). Die Ausbeute an diploid-tetraploid-Mosaiken betrug 68 %. Bei keinem der Mausmehrzeller war der Fusionserfolg fraglich. 10 % der insgesamt in die Versuche einbezogenen Embryonen degenerierten.

TAB. 24: Zusammenfassung der Fusionsergebnisse von Mehrzell-embryonen der Maus

n	fus.	fusioniert zu		Fusion		
		2n/4n-Mosaik	>4n-Embryo	fraglich	nicht fus.	deg.
459	387	311	76	0	27	45
(%) *	84	68/80 **	16/20 **	0	6	10

*: % bezogen auf die Gesamtzahl n

** : % bezogen auf die fusionierten Embryonen

In den Versuchen zur Erstellung von diploid-tetraploid-Mosaiken wurde der Einfluß der Alignmentdauer, der Pulsanzahl, der Pulsdauer, der Pulsstärke sowie deren Kombinationen auf das Fusionsergebnis untersucht.

4.2.1.1.1 Einfluß der Alignmentdauer

Das einwirkende Wechselstromfeld vor Auslösung der Fusionspulse diente der Schaffung eines engeren Membrankontaktes benachbarter Blastomeren eines Mehrzellers. Die Dauer des Alignments wurde bei Mäusemehrzellern zwischen 5 und 20 Sekunden variiert.

Die Fusionsraten von Mehrzellembryonen der Maus unterschieden sich bei Alignmentdauern von unter 10 und 10-20 s nicht (83%). Ebenso waren die Raten an diploid-tetraploid-Mosaiken mit 69 % und 66 % und die Degenerationsraten mit 12 % und 8 % nicht signifikant verschieden. Bei der Maus konnte unabhängig von der Alignmentdauer bei allen Embryonen sicher unterschieden werden, ob eine Fusion stattgefunden hatte oder nicht (Tab. 25).

TAB. 25: Einfluß der Alignmentdauer auf die Fusionsraten von Mehrzellembryonen der Maus

Align- ment- dauer (s)	n	fus.	fusioniert zu		Fusion		deg.
			2n/4n- Mosaik	>4n- Embryo	frag- lich	nicht fus.	
< 10	229	191	159	32	0	10	28
	(%) *	83	69/83**	14/17**	0	5	12
10-20	219	185	145	40	0	17	17
	(%) *	84	66/78**	18/22**	0	8	8

* % bezogen auf die Gesamtzahl n

** % bezogen auf die fusionierten Embryonen

4.2.1.1.2 Einfluß der Pulsanzahl

Bei der Fusion von Mehrzellembryonen wurde der Einfluß verschiedener Pulsanzahlen auf das Fusionsergebnis untersucht. Bei Mausembryonen wurde die Pulsanzahl von 1 bis 5 Pulsen variiert.

Die Verwendung von zwei Fusionspulsen führte bei Mausemehrzellern zur höchsten Fusionsrate mit 97 % (Tab. 26). Die Fusionsrate war signifikant ($p < 0,001$) größer als die Rate, die bei Anwendung von einem Fusionspuls erzielt werden konnte (72%), unterschied sich jedoch nicht signifikant von der Fusionsrate, die durch drei Fusionspulse erzielt wurde (77 %). Die Rate an erhaltenen diploid-tetraploid-Mosaiken mit 85 % bezüglich aller verwendeten Embryonen war bei Verwendung von zwei Fusionspulsen ebenfalls signifikant höher ($p < 0,001$) als bei Verwendung von einem oder drei Fusionspulsen. Die Degenerationsrate war bei Anwendung von einem Fusionspuls mit 20 % signifikant ($p < 0,001$) größer als die Degenerationsrate bei

TAB. 26: Einfluß der Pulsanzahl auf das Fusionsergebnis von Mehrzellembryonen der Maus

Puls- anzahl	n	fusioniert zu			Fus. fragl.	nicht fus.	deg.
		fus.	2n/4n- Mosaik	>4n- Embryo			
1	114	82 ^a	55 ^d	27	0	9	23 ^g
	(%) [*]	72	48/67 ^{**}	24/33 ^{**}	0	8	20
2	149	145 ^b	127 ^e	18	0	0	4 ^h
	(%) [*]	97	85/88 ^{**}	12/12 ^{**}	0	0	3
3	123	95 ^c	80 ^f	15	0	14	14 ⁱ
	(%) [*]	77	65/84 ^{**}	12/16 ^{**}	0	11,5	11,5

a:b = p<0,001[#]

b:c = p<0,001

d:e = p<0,001

d:f = p<0,05

e:f = p<0,001

g:h = p<0,001

h:i = p<0,05

[#]Auswertung mit dem χ^2 -Test

^{*} % bezogen auf die Gesamt-
zahl n

^{**} % bezogen auf die fusio-
nierten Embryonen

zwei Fusionspulsen (3 %), unterschied sich jedoch nicht signifikant von der Degenerationsrate bei Verwendung von drei Fusionspulsen.

Bei Verwendung von 5 Fusionspulsen fusionierten mit 94 % (48/51) signifikant mehr Embryonen als bei Verwendung von drei Fusionspulsen. Die Ausbeute an diploid-tetraploid-Mosaiken war mit 71 % (36/51) dabei nicht signifikant kleiner als bei Verwendung von 2 Fusionspulsen.

4.2.1.1.3 Einfluß der Pulsdauer

Zur Untersuchung des Einflusses der Pulsdauer auf die Fusionsergebnisse von Mehrzellembryonen wurde die Pulsdauer bei Mäuseembryonen von 60 bis 90 μ s variiert.

Mit Steigerung der Pulsdauer von 60 auf 70 μ s nahm die Fusionsrate von Mehrzellern von 88,5 % auf 91 % zu (Tab. 27).

TAB. 27: Einfluß der Pulsdauer auf das Fusionsergebnis von Mehrzellembryonen der Maus

Puls- dauer (μ s)	n	fus.	fusioniert zu		Fus.		
			2n/4n- Mosaik	>4n- Embryo	frag- lich	nicht fus.	deg.
60	70	62 ^a	57 ^e	5	0	2	6 ^l
	(%) [*]	88	81/92 ^{**}	7/ 8 ^{**}	0	3	9
70	266	241 ^b	200 ^f	41	0	14	11 ^k
	(%) [*]	91	75/83 ^{**}	16/17 ^{**}	0	5	4
80	61	48 ^c	37 ^g	11	0	7	6 ^l
	(%) ^{**}	79	61/77 ^{**}	18/23 ^{**}	0	11	10
90	61	35 ^d	17 ^h	18	0	4	22 ^m
	(%) [*]	57	28/49 ^{**}	29/51 ^{**}	0	7	36

a:d = $p < 0,001$ [#]

b:c = $p < 0,05$

c:d = $p < 0,05$

b:d = $p < 0,001$

e:g = $p < 0,05$

e:h = $p < 0,001$

f:g = $p < 0,05$

g:h = $p < 0,001$

f:h = $p < 0,001$

i:m = $p < 0,001$

k:m = $p < 0,001$

l:m = $p < 0,01$

[#]Auswertung mit dem χ^2 -Test

^{*} % bezogen auf die Gesamtzahl n

^{**} % bezogen auf die fusionierten Embryonen

Diese Zunahme war jedoch statistisch nicht signifikant. Bei weiterer Steigerung der Pulsdauer auf 80 und 90 μ s nahm die Fusionsrate wieder auf 79 % bzw. 57 % ab und war signifikant kleiner ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,001$) als die Fusionsrate bei 70 μ s-Pulsen.

Die Ausbeute an diploid-tetraploid-Mosaiken war bei Fusionen mit Pulsen von 60 μ s am größten. 81 % aller in die Versuche einbezogenen Mehrzeller der Maus fusionierten dabei zu Mosaiken. Die Steigerung der Pulsdauer von 60 μ s auf 70 μ s führte zu keiner signifikanten Verringerung der Mosaikrate. Bei Steigerung der Pulsdauer von 60 auf 70 μ s verminderte sich die Rate degenerierter Embryonen von 8,5 % auf 4 %. Bei Steigerung der Pulsdauer von 80 μ s auf 90 μ s stieg die Degenerationsrate signifikant ($p < 0,01$) von 10 % auf 36 % an.

4.2.1.1.4 Einfluß der Pulsstärke

Die angelegte Feldspannung für die Fusion von Mäusemehrzell-embryonen wurde von 0,50 kV/cm bis 0,89 kV/cm variiert.

Mit Erhöhung der Feldspannung nahm bei der Fusion von Mehrzellembryonen der Maus die Rate an fusionierten Embryonen ab (Tab. 28). Sie war bei einer Spannung von $< 0,60$ kV/cm mit 91% am höchsten und bei einer Spannung von 0,70 bis 0,89 kV/cm mit 80 % signifikant ($p < 0,05$) niedriger. Gleichzeitig nahm die Rate an erhaltenen diploid-tetraploid-Mosaiken bezüglich aller Embryonen von 78 % über 67 % auf 58 % signifikant ($p < 0,05$) ab. Gegenläufig nahm die Rate degenerierter Embryonen von 2 % über 9 % auf 20 % signifikant ($p < 0,001$) zu.

TAB. 28: Einfluß der Pulsstärke auf das Fusionsergebnis von Mehrzellembryonen der Maus

Feldspannung (kV/cm)	n	fusioniert zu			Fus.		deg.
		fus.	2n/4n- Mosaik	>4n- Embryo	frag- lich	nicht fus.	
< 0,60	109	99 ^a	85 ^c	14	0	8	2 ^e
	(%) [*]	91	78/86 ^{**}	13/14 ^{**}	0	7	2
0,60-0,69	242	202	163	39	0	19	21 ^f
	(%) [*]	83	67/81 ^{**}	16/19 ^{**}	0	8	9
0,70-0,89	108	86 ^b	63 ^d	23	0	0	22 ^g
	(%) [*]	80	58/73 ^{**}	22/27 ^{**}	0	0	20

a:b = p<0,05[#]

[#]Auswertung mit dem χ^2 -Test

c:d = p<0,05

^{*} % bezogen auf die Gesamtzahl n

e:f = p<0,05

^{**} % bezogen auf die fusionierten Embryonen

e:g = p<0,001

f:g = p<0,01

4.2.1.2 In vivo Kultur von diploid-tetraploid-Mosaiken

Um die Entwicklungspotenz entstandener diploid-tetraploid-Mosaiken zu untersuchen, wurden diese in pseudogravide Empfängertiere transferiert.

Bei der Maus wurden die Empfängertiere, deren Körpergewichtszunahme stagnierte oder die an Körpergewicht verloren, getötet und auf vorhandene Embryonen oder Resorptionsstellen untersucht. Bei Tieren, die eine konstante Gewichtszunahme zeigten, wurde der errechnete Wurftermin abgewartet.

In 17 Transfers bei der Maus wurden 285 diploid-tetraploid-Mosaiken übertragen. Je zwei Transfers wurden für in vivo Kul-

turen über die Dauer von 10, 11, 14, 17, 18, und 19 Tagen gemacht, je ein Transfer für die Dauer von 12 und 13 Tagen und 3 Transfers für die in vivo Kultur über 20 Tage. In einem Empfängertier wurden am Tag 11 der in vivo Kultur ein normal entwickelter Embryo, drei degenerierte Embryonen und eine Resorptionsstelle gefunden. In einem zweiten Empfängertier wurden am Tag 20 der in vivo Kultur eine Resorptions- und eine Plazentationsstelle gefunden. Dieses Tier hatte vom Vortag bis zum Tag der Sektion mehrere Gramm an Gewicht verloren. Vermutlich hatte das Tier ein Jungtier geboren und nach der Geburt aufgeessen.

Zwei Tiere kamen am Tag 18 bzw. 19 nach Transfer zur Geburt.

Aus 19 transferierten diploid-tetraploid-Mosaiken wurden 3 Tiere geboren. 4 Jungtiere resultierten aus dem Transfer von 23 transferierten Kontrollembrionen (Tab. 29). Die Überlebensrate der Mosaiken unterschied sich mit 16 % (3/19) im χ^2 -Test nicht signifikant von der Überlebensrate der Kontrollembrionen mit 17 % (4/23). Alle Tiere wurden lebend geboren und waren normal ausgebildet.

TAB. 29: Ergebnisse nach Austragen transferierter diploid-tetraploid-Mosaiken der Maus

Empf.- tier	transf. Mosaiken	transf. Kontr.	Tag d. Geburt	geborene Tiere aus Mosaiken	geborene Tiere aus Kontrollen
1	7	11 (AZ,M)	19	1	3
2	12	12 (M)	18	2	1
Summe	19	23		3	4

4.2.2 Kaninchen

4.2.2.1 Elektrofusion

In die Fusionsversuche von Mehrzellembryonen des Kaninchens wurden 486 Drei-, Vier- und Achtzellembryonen sowie frühe und kompaktierte Morulae einbezogen.

Die Fusionsrate von frühen Morulae des Kaninchens lag mit 42% signifikant ($p < 0,001$) unter der Fusionsrate der Achtzeller (91 %) und der kompaktierten Morulae (88 %). Die Fusionsraten der Achtzeller und der kompaktierten Morulae unterschieden sich nicht signifikant (Tab. 30). Bei Berücksichtigung aller in die Versuche einbezogenen Embryonen war die Ausbeute an

TAB. 30: Fusionsergebnisse verschiedener Mehrzellstadien von Kaninchenembryonen

Mehrzell- stadium	n	fus.	fusioniert zu		Fus. frag- lich	nicht fus.	deg.
			2n/4n- Mosaik	>4n- Embryo			
AZ	112	102 ^a	98 ^d	4	9 ^g	0	1
	(%) [*]	91	88/96 ^{**}	3/4 ^{**}	8	0	1
FM	170	72 ^b	72 ^e	0	98 ^h	0	0
	(%) [*]	42	42/100 ^{**}	0/0 ^{**}	58	0	0
KM	162	143 ^c	143 ^f	0	19 ⁱ	0	0
	(%) [*]	88	88/100 ^{**}	0/0 ^{**}	12	0	0

a:b = $p < 0,001$ [#]

h:i = $p < 0,001$

b:c = $p < 0,001$

^{*} % bezogen auf die Gesamtzahl n

d:e = $p < 0,001$

^{**} % bezogen auf die fusionierten Embryonen

e:f = $p < 0,001$

[#]Auswertung mit dem χ^2 -Test

g:h = $p < 0,001$

entstandenen Mosaiken bei Achtzellern und kompaktierten Morulae mit 88 % gleich groß und lag signifikant ($p < 0,001$) über der von frühen Morulae (42 %). Bei 8 % der Achtzeller und 12 % der kompaktierten Morulae war der Fusionserfolg unsicher, wobei kein signifikanter Unterschied festzustellen war. Dagegen war die Rate von Mehrzellern mit unsicherem Fusionserfolg bei den frühen Morulae mit 58 % signifikant ($p < 0,001$) größer als die der Achtzeller und kompaktierten Morulae. Die Degenerationsraten der frühen und kompaktierten Morulae waren gleich Null und unterschieden sich nicht signifikant von der Degenerationsrate der Achtzellembryonen (1 %).

Eine Zusammenfassung der Fusionsergebnisse von Mehrzellembryonen des Kaninchens gibt Tabelle 31.

Die Fusionsrate der Kaninchenmehrzeller betrug 72 %. 69 % aller in die Versuche einbezogenen Embryonen fusionierten zu diploid-tetraploid-Mosaiken. In bezug auf die fusionierten Embryonen betrug die Rate an Mosaikembryonen 96 %. Bei 26 % der Embryonen konnte nicht sicher gesagt werden, ob eine Fusion der Blastomeren stattgefunden hatte. 3 von 486 (0 %) Mehrzellern degenerierten bei den Fusionsversuchen.

TAB. 31: Zusammenfassung der Fusionsergebnisse von Mehrzellembryonen des Kaninchens

n	fus.	fusioniert zu		Fus. fragl.	nicht fus.	deg.
		2n/4n- Mosaik	>4n- Embryo			
486	349	336	13	126	8	3
(%) *	72	69/96**	3/4**	26	2	0

*: % bezogen auf die Gesamtzahl n

**: % bezogen auf die fusionierten Embryonen

4.2.2.1.1 Einfluß der Alignmentdauer

Die Dauer des Alignments wurde bei Kaninchenmehrzellern zwischen 5 und 20 Sekunden variiert.

TAB. 32: Einfluß der Alignmentdauer auf die Fusionsraten von Mehrzellembryonen des Kaninchens

Align- ment- dauer (s)	n	fus.	fusioniert zu		Fus.		
			2n/4n- Mosaik	>4n- Embryo	frag- lich	nicht fus.	deg.
< 10	129	123 ^a	123 ^c	0	0 ^e	5	1
	(%) [*]	95	95/100 ^{**}	0/0 ^{**}	0	4	1
10-20	341	212 ^b	206 ^d	6	126 ^f	2	1
	(%) [*]	62	60/97 ^{**}	2/3 ^{**}	37	1	0

a:b = $p < 0,001$ # Auswertung mit dem χ^2 -Test

c:d = $p < 0,001$ * % bezogen auf die Gesamtzahl n

e:f = $p < 0,001$ ** % bezogen auf die fusionierten Embryonen

Die Fusionsraten der Embryonen sanken mit ansteigender Dauer des Alignments signifikant ($p < 0,001$) von 95 % auf 62 % (Tab. 32). Ebenso nahm die Rate an diploid-tetraploid-Mosaiken mit steigender Alignmentdauer signifikant ($p < 0,001$) von 95 % auf 60 % ab.

Bei den Kaninchenembryonen konnte nur dann sicher unterschieden werden, ob eine Fusion stattgefunden hatte oder nicht, wenn die Dauer des Alignments 10 Sekunden nicht überstieg. Der Fusionsausgang konnte bei 37 % aller verwendeten Embryonen nicht beurteilt werden, wenn die Alignmentdauer 10 bis 20 Sekunden betrug. Die Degenerationsraten von 1 % bei einem

Alignment von weniger als 10 s und 0 % bei 10 bis 20 Sekunden unterschieden sich im χ^2 -Test nicht signifikant voneinander.

4.2.2.1.2 Einfluß der Pulsanzahl

Die Pulsanzahl wurde bei der Fusion von Kaninchenmehrzellembryonen von 1 bis 5 Pulsen variiert.

TAB. 33: Einfluß der Pulsanzahl auf das Fusionsergebnis von Mehrzellembryonen des Kaninchens

Puls- anzahl	n	fus.	fusioniert zu		Fus.		
			2n/4n- Mosaik	>4n- Embryo	frag- lich	nicht fus.	deg.
2	129	61 ^a	61 ^c	0	67 ^e	1	0
	(%) [*]	47	47/100 ^{**}	0/0 ^{**}	52	1	0
3	293	227 ^b	223 ^d	4	59 ^f	6	1
	(%) [*]	78	76/98 ^{**}	2/2 ^{**}	20	2	0

a:b = $p < 0,001$ [#] [#]Auswertung mit dem χ^2 -Test

c:d = $p < 0,001$ ^{*} % bezogen auf die Gesamtzahl n

e:f = $p < 0,001$ ^{**} % bezogen auf die fusionierten Embryonen

Bei den Kaninchen konnte die Fusionsrate durch Steigerung der Pulsanzahl von zwei auf drei Pulse von 47 % auf 78 % und der Anteil an erhaltenen Mosaiken von 47 % auf 76 % jeweils signifikant ($p < 0,001$) gesteigert werden (Tab. 33). Gleichzeitig verringerte sich der Anteil der Embryonen mit unsicherem Fusionsergebnis signifikant ($p < 0,001$) von 52 % auf 20 %. Die Mehrzeller zeigten bei Verwendung von zwei Fusionspulsen keinerlei Degenerationerscheinungen. Nur einer von 293 Embryonen degenerierte bei Anwendung von drei Fusionspulsen.

Bei Steigerung der Pulsanzahl von 3 auf 5 fusionierten mit 98% (47/48) signifikant ($p < 0,01$) mehr der Kaninchenmehrzeller. Die Rate an erhaltenen Mosaiken steigerte sich dabei signifikant ($p < 0,05$) auf 94 % (45/48). Bei keinem der Mehrzeller war das Fusionsergebnis unsicher.

4.2.2.1.3 Einfluß der Pulsdauer

Bei Mehrzellern des Kaninchens wurde die Pulsdauer zwischen 60 und 70 μ s variiert.

Die Fusionsrate nahm bei Verlängerung der Pulsdauer von 60 auf 70 μ s von 99 % auf 62 % signifikant ($p < 0,001$) ab (Tab. 34). Pulse der Dauer von 70 μ s führten bei 36 % der Kaninchenembryonen zu einem unsicheren Fusionsergebnis, während dies bei Pulsen von 60 μ s bei keinem Embryo der Fall war (Unterschied signifikant mit $p < 0,001$).

TAB. 34: Einfluß der Pulsdauer auf das Fusionsergebnis von Mehrzellembryonen des Kaninchens

Puls- dauer (μ s)	n	fus.	fusioniert zu		Fus. frag- lich	nicht	
			2n/4n- Mosaik	>4n- Embryo		fus.	deg.
60	114	113 ^a	113 ^c	0	0 ^e	0	1
	(%) [*]	99	99/100 ^{**}	0/0 ^{**}	0	0	1
70	351	218 ^b	214 ^d	4	126 ^f	7	0
	(%) [*]	62	61/ 98 ^{**}	1/2 ^{**}	36	2	0

a:b = $p < 0,001$ [#]

c:d = $p < 0,001$

e:f = $p < 0,001$

[#]Auswertung mit dem χ^2 -Test

^{*} % bezogen auf die Gesamtzahl n

^{**} % bezogen auf die fusionierten Embryonen

Die Ausbeute an diploid-tetraploid-Mosaiken war mit Pulsen von 60 μ s am größten. 99 % aller Mehrzeller des Kaninchens fusionierten dabei zu Mosaiken. Die Steigerung der Pulsdauer von 60 μ s auf 70 μ s führte zu keiner signifikanten Verringerung der Mosaikrate ($p < 0,001$).

Bei Steigerung der Pulsdauer von 60 auf 70 μ s verminderte sich die Rate degenerierter Embryonen von 1 % auf 0 % nicht signifikant.

4.2.2.1.4 Einfluß der Pulsstärke

Die angelegte Feldspannung für die Fusion von Kaninchenmehrzellern wurde von 0,50 kV/cm bis 0,89 kV/cm variiert.

TAB. 35: Einfluß der Pulsstärke auf das Fusionsergebnis von Mehrzellembryonen des Kaninchens

Feldspannung (kV/cm)	n	fus.	fusioniert zu		Fus.		
			2n/4n- Mosaik	>4n- Embryo	frag- lich	nicht fus.	deg.
< 0,60	82 (%) *	35 ^a	35 ^d	0	40	7	0
		43	43/100 ^{**}	0/0 ^{**}	49	8	0
0,60-0,69	228 (%) *	160 ^b	160 ^e	0	67	0	1
		70	70/100 ^{**}	0/0 ^{**}	29	0	1
0,70-0,89	167 (%) *	146 ^c	140 ^f	6	19	1	1
		87	84/96 ^{**}	3/4 ^{**}	11	1	1

a:b = $p < 0,001$ # Auswertung mit dem χ^2 -Test

b:c = $p < 0,001$ * % bezogen auf die Gesamtzahl n

d:e = $p < 0,001$ ** % bezogen auf die fusionierten Embryonen

d:f = $p < 0,001$

e:f = $p < 0,05$

Die Fusionsrate der Embryonen nahm mit steigender Feldspannung zu (Tab. 35). Bei Feldspannungen von unter 0,60 kV/cm lag die Fusionsrate bei 43 %. Bei einer Feldspannung von 0,60-0,69 kV/cm fusionierten mit 70 % signifikant ($p < 0,001$) mehr Embryonen. Mit Steigerung der Feldspannung von 0,60-0,69 kV/cm auf 0,70-0,89 kV/cm stieg die Fusionsrate nochmals signifikant ($p < 0,001$) auf 87 % an. Mit steigenden Fusionsraten stieg auch die Rate an diploid-tetraploid-Mosaiken von 43 % über 70 % auf 84 % signifikant ($p < 0,001$) an. Dagegen nahm die Rate der Embryonen mit unsicherem Fusionsergebnis von 49 % über 29 % auf 11 % signifikant ($p < 0,001$) ab.

4.2.2.2 In vivo Kultur von diploid-tetraploid-Mosaiken

Um die frühe Entwicklung der transferierten Mosaikembryonen beim Kaninchen verfolgen zu können, wurde eine in vivo Kultur über vier Tage ausgeführt. Bei diesem Transfer wurden 43 diploid-tetraploid-Mosaiken übertragen. Am Tag 4 nach Transfer konnten 20 der 43 Embryonen (47 %) wiedergefunden werden. 14 der wiedergefundenen Embryonen (70 %) waren degeneriert. Die restlichen 6 Embryonen hatten sich zu Blastozysten entwickelt. Die Überlebensrate der diploid-tetraploid-Mosaiken betrug somit 14 % (6/43).

In 14 Transfers wurden 313 diploid-tetraploid-Mosaiken, 67 Mehrzeller mit unsicherem Fusionserfolg und 14 Kontrollembryonen übertragen (Tab. 36). 6 von 14 Empfängertieren warfen 13 Jungtiere aus diploid-tetraploid-Mosaiken, 20 Tiere aus Embryonen mit unsicherem Fusionserfolg und 3 Kontrolltiere. Die Graviditätsrate betrug 43 % (6/14). 4 % der übertragenen diploid-tetraploid-Mosaiken, 30 % der übertragenen Embryonen mit unsicherem Fusionsergebnis und 21 % der Kontrollembryonen wurden geboren. Die Überlebensrate der Tiere aus dem Transfer von Mehrzellembryonen mit unsicherem Fusionsergebnis war damit signifikant größer ($p < 0,001$) als die Überlebensrate der Kontrollembryonen und signifikant größer ($p < 0,05$) als die

Überlebensrate von Tieren aus dem Transfer von diploid-tetraploid-Mosaiken. 2 Jungtiere aus Mosaiken und 4 Jungtiere aus Transfer von Embryonen mit unsicherem Fusionsergebnis wurden tot geboren. Dies entspricht einer Totgeburtenrate von 15 % (2/13) bzw. 20 % (4/20). Im χ^2 -Test unterschieden sich die Totgeburtenraten nicht signifikant voneinander.

Tab. 36: Ergebnisse aus den Transfers von diploid-tetraploid-Mosaiken beim Kaninchen

Gruppe	Anzahl Trans- fers	transferierte 2n/4n- Mosaiken	Kon.	Geburt		geborene Tiere aus 2n/4n- Mosaiken		Kon.
				ja	nein			
Mosaiken ohne Ko.	9	235	-	2	7	5		-
Mosaiken + Ko.	3	78	14	2	1	8		3
MZ mit un- sicherer Fus.+ Ko.	2	67	-	2	0	20		-
Summe	14	313/67*	14	6	8	13/20*		3

* transferierte Mehrzeller mit unsicherem Fusionserfolg

Die geborenen Kontrolltiere waren alle lebend. Die tot geborenen Jungtiere zeigten keinerlei äußere Abnormalität. Ebenso war das Exterieur und Verhalten aller lebend geborenen Jungtiere unauffällig. Bis zum Zeitpunkt der beginnenden Untersuchung der Tiere im Alter von fünf Monaten starben 2 der 11 lebend geborenen Kaninchen aus den Transfers von diploid-tetraploid-Mosaiken.

4.2.2.3 Untersuchung der geborenen Jungtiere aus Transfers von fusionierten Mehrzellembryonen

Von 8 geborenen Kaninchen aus dem Transfer von diploid-tetraploid-Mosaiken wurden insgesamt 56 Organproben mit Hilfe des Cytofluorometers untersucht. Von Tieren aus dem Transfer von Mehrzellembryonen mit unsicherem Fusionsergebnis kamen 89 Organproben von 12 Tieren zur Untersuchung. 31 Organproben von vier Kaninchen dienten als Kontrollen. Drei dieser Kaninchen stammten aus dem Transfer von Kontrolllembryonen, die neben fusionierten Mehrzellern übertragen worden waren. Ein Kaninchen, dessen Alter dem der Kaninchen aus den Fusionsversuchen entsprach, wurde willkürlich aus dem zur Verfügung stehenden Tierbestand ausgewählt. Nachfolgend werden die Ergebnisse der Probenuntersuchungen von Milz, Leber, Nieren, Nebennieren, Lunge, Knochenmark, Magenschleimhaut und der Gonaden aufgeführt (Tab. 37).

Neben vier Milzproben von Kontrolltieren wurden sieben Milzproben von Kaninchen aus dem Transfer von diploid-tetraploid-Mosaiken und elf Milzproben von Kaninchen aus dem Transfer von Mehrzellembryonen mit unsicherem Fusionsergebnis untersucht. Keine der untersuchten Organproben zeigte eine stärkere DNA-Fluoreszenz als die Organproben der Kontrolltiere.

Bei der Untersuchung von sieben Leberproben von Kaninchen aus dem Transfer von diploid-tetraploid-Mosaiken fiel bei drei Proben eine erhöhte DNA-Fluoreszenz der Zellen auf. Erkennbar war die erhöhte Fluoreszenz an der Rechtsverschiebung des Peaks, der die Fluoreszenzintensität der Mehrheit der gemessenen Zellen darstellt. Die Rechtsverschiebung ergab sich aus dem Vergleich mit den Peaks, die aus den gemessenen Leberproben von vier Kontrolltieren vorlagen (Abb. 11). Von 12 Leberproben von Kaninchen, die aus dem Transfer von Mehrzellembryonen mit unsicherem Fusionserfolg stammten, wurde in drei Proben ebenfalls eine Rechtsverschiebung und damit ein erhöhter DNA-Gehalt der Zellen gemessen.

Tab. 37: Untersuchungsergebnisse aus den Messungen des DNA-Gehaltes einzelner Organe von Kontrolltieren (A), Tieren aus Transfer von diploid-tetraploid-Mosaiken (B) und Tieren aus dem Transfer von Mehrzellern mit unsicherem Fusionserfolg (C)

Gruppe	Organ	Anzahl gemessener Proben	unauffällig	Rechtsverschiebung	Doppelpeak
A	Milz	4	4	0	0
	Leber	4	4	0	0
	Nieren	3	3	0	0
	Nebennieren	4	3	1	0
	Lunge	4	4	0	0
	Knochenmark	4	4	0	0
	Magenschl.haut	4	4	0	0
	Hoden	2	2	0	0
B	Ovarien	2	2	0	0
	Milz	7	7	0	0
	Leber	7	4	3	0
	Nieren	7	3	4	0
	Nebennieren	7	3	4	0
	Lunge	7	6	1	0
	Knochenmark	7	5	1	1
	Magenschl.haut	7	7	0	0
C	Hoden	5	3	1	1
	Ovarien	2	2	0	0
	Milz	11	11	0	0
	Leber	12	9	3	0
	Nieren	12	10	2	0
	Nebennieren	11	7	4	0
	Lunge	10	10	0	0
	Knochenmark	11	7	2	2
	Magenschl.haut	11	8	3	0
	Hoden	6	6	0	0
	Ovarien	5	5	0	0

Vier von sieben gemessenen Nierenproben von Kaninchen aus transferierten diploid-tetraploid-Mosaiken zeigten gegenüber den Nierenproben von drei Kontrolltieren eine Rechtsverschiebung des Fluoreszenz-Peaks. Bei zwölf Nierenproben aus Tieren, die dem Transfer von Mehrzellern mit unsicherem Fusions-

relative
Zellzahl

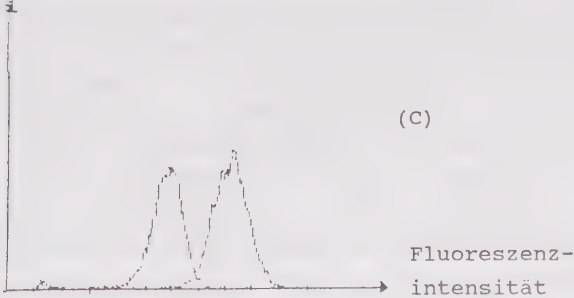
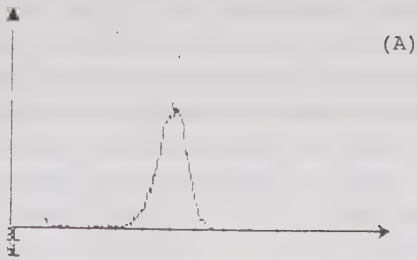


Abbildung 11: Meßergebnisse der Cytofluorometrie von Leberzellen; Rechtsverschiebung

(A) Kontrolltier; (B) Tier aus Transfer von diploid-tetraploid-Mosaiken; (C) Fluoreszenzpeaks von A und B vergleichend. Zu erkennen ist der im Vergleich zu dem Peak des Kontrolltieres nach rechts verschobene Peak des Tieres aus Mosaiktransfer.

ergebnis entstammten, zeigten zwei Proben ebenfalls diese Rechtsverschiebung und somit einen erhöhten DNA-Gehalt der Zellen.

In Nebennierenproben aus sieben dem Transfer von diploid-tetraploid-Mosaiken entstammenden Tieren wurden bei vier Proben Zellen gefunden, deren DNA-Gehalt größer war als der DNA-Gehalt von Zellen, die aus Nebennieren von drei Kontrolltieren stammten. Zu erkennen war der erhöhte DNA-Gehalt wiederum an einer Rechtsverschiebung des Fluoreszenz-Peaks gegenüber den Peaks von Kontrollproben. Diese Rechtsverschiebung war außerdem in vier von elf untersuchten Nebennierenproben zu finden, die von Tieren aus dem Transfer von nicht sicher fusionierten Mehrzellern stammten. Überraschenderweise war solch eine Rechtsverschiebung ebenfalls bei der Nebennierenprobe eines Kontrolltieres zu finden. Dieses Kontrolltier stammte aus dem gleichzeitigen Transfer von unbehandelten und mit Hilfe von Farbmarkern identifizierbaren Kontrollembryonen und diploid-tetraploid-Mosaiken. Möglicherweise war von der Anpaarung der Elterntiere falsch auf die zu erwartende Fellfarbe der entstehenden Jungtiere rückgeschlossen worden. Somit könnte es sich statt um ein Kontrolltier um ein Tier aus dem Transfer von diploid-tetraploid-Mosaiken handeln, was die Rechtsverschiebung des Peaks erklären würde.

Die Untersuchungen der Lungenproben von sieben dem Transfer von diploid-tetraploid-Mosaiken entstammenden Tieren ergab im Vergleich zu Lungenproben von vier Kontrolltieren bei einem Tier eine Rechtsverschiebung des Fluoreszenz-Peaks. Keine der Lungenproben von zehn Tieren aus Transfer von nicht sicher fusionierten Mehrzellembryonen zeigte Auffälligkeiten im DNA-Gehalt ihrer Zellen.

Gegenüber vier Knochenmarksproben von Kontrolltieren zeigte ein Tier aus Transfer von diploid-tetraploid-Mosaiken eine Rechtsverschiebung des Fluoreszenz-Peaks seiner Knochenmarkszellen. Ein anderes Tier aus dieser Gruppe zeigte zwei Peaks:

der zweite Peak war in dem Fluoreszenzbereich zu finden, der der doppelten Fluoreszenz des ersten Peaks entsprach (Abb. 12). Es waren also Zellen vorhanden, deren DNA-Gehalt doppelt so groß war wie der DNA-Gehalt der anderen Zellen. Von elf Tieren aus dem Transfer von Mehrzellembryonen mit unsicherem Fusionsergebnis zeigten zwei Proben eine Rechtsverschiebung des Fluoreszenz-Peaks. In zwei weiteren Proben waren jeweils zwei Peaks vorhanden, die auf das Erscheinen von Zellen rück-schließen ließen, die denselben DNA-Gehalt wie die Zellen der Kontrolltiere aufwiesen und auf Zellen, deren DNA-Gehalt doppelt so groß wie der der Kontrolltiere war.

Gegenüber vier gemessenen Magenschleimhautproben von Kontrolltieren zeigten die Messungen der Magenschleimhautproben von sieben Kaninchen aus dem Transfer von diploid-tetraploid-Mosaiken keine Abweichungen. Dagegen zeigte sich in drei von elf gemessenen Proben von Tieren aus dem Transfer von nicht sicher fusionierten Mehrzellern eine Rechtsverschiebung des Fluoreszenz-Peaks.

Im Vergleich mit zwei gemessenen Proben von Hoden von Kontrolltieren zeigte keine der sechs gemessenen Proben von Tieren aus dem Transfer nicht sicher fusionierter Mehrzellembryonen Abweichungen im DNA-Gehalt der Zellen. Dagegen war von fünf Tieren aus dem Transfer von diploid-tetraploid-Mosaiken bei einem Tier eine Rechtsverschiebung des Fluoreszenz-Peaks und bei einem anderen Tier ein Doppelpeak zu finden. Dies wies auf den erhöhten DNA-Gehalt in den Hodenzellen des einen Tieres und auf unterschiedliche, sich um das Doppelte unterscheidende DNA-Gehalte in den Hodenzellen des anderen Tieres hin.

Die Ovarialzellen von drei Tieren aus dem Transfer von diploid-tetraploid-Mosaiken und von fünf Tieren aus dem Transfer von nicht sicher fusionierter Mehrzellembryonen wiesen im Vergleich mit den Ovarialzellen von zwei Kontrolltieren keine Abweichungen in ihrer Fluoreszenzintensität auf.

relative
Zellzahl

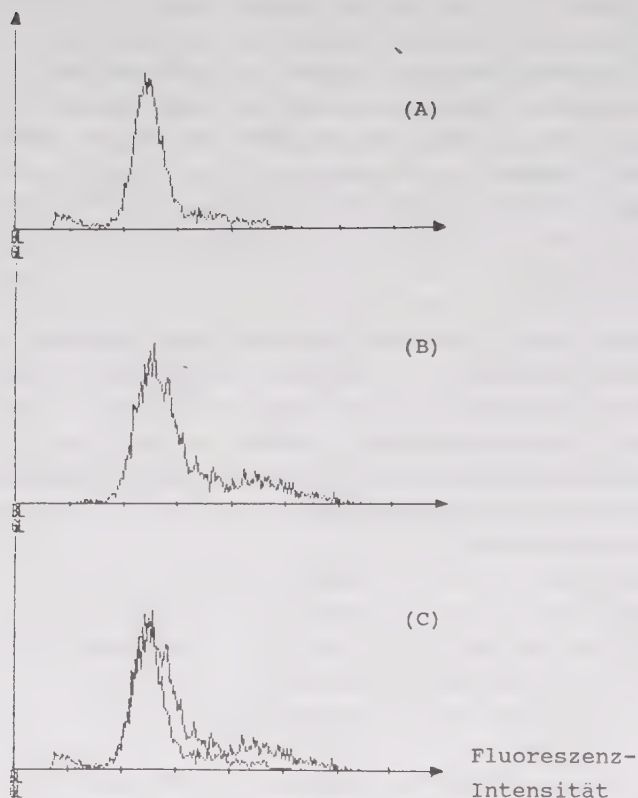


Abbildung 12: Meßergebnisse der Cytofluorometrie von Knochenmarkszellen; Doppelpeak

(A) Kontrolltier; (B) Tier aus Transfer von diploid-tetraploid-Mosaiken; (C) Fluoreszenzpeaks von A und B vergleichend. Zu erkennen ist ein zweiter Fluoreszenzpeak bei Tier B, der im Bereich der doppelten Fluoreszenz des Peaks von Tier A liegt.

In Tabelle 38 sind die DNA-Meßergebnisse aller Organproben von untersuchten Kontrolltieren, Tieren aus dem Transfer von diploid-tetraploid-Mosaiken und Tieren aus dem Transfer von Mehrzellern mit unsicherem Fusionserfolg zusammengefaßt.

TAB. 38: Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Messungen des DNA-Gehaltes von Zellen aus Kontrolltieren, Tieren aus dem Transfer von Mehrzellern mit unsicherem Fusionserfolg und Tieren aus dem Transfer von diploid-tetraploid Mosaiken

	Anzahl gemessener Proben	unauffällig	Rechtsverschiebung	Doppelpeak
Kontrolltiere	31	30 (97 %) ^a	1 (3 %) ^c	0
Tiere aus unsicherer Fus.	89	73 (82 %)	14 (16 %)	2 (2 %)
Tiere aus Mosaiktransfer	56	40 (71 %) ^b	14 (25 %) ^d	2 (4 %)

a:b = $p < 0,05^*$

*Auswertung mit dem χ^2 -Test

c:d = $p < 0,05$

Der Anteil von Tieren mit unauffälligem DNA-Gehalt der Zellen war bei den Tieren aus Transfer von Embryonen mit unsicherem Fusionsergebnis nicht signifikant kleiner (82 %) als der Anteil bei den Kontrolltieren (97 %). Bei Tieren aus Transfer von diploid-tetraploid-Mosaiken jedoch war der Anteil der unauffälligen Tiere signifikant kleiner ($p < 0,05$) als der Anteil bei den Kontrolltieren. Ebenso war der Anteil der Tiere signifikant erhöht ($p < 0,05$), bei denen ein erhöhter DNA-Gehalt der Zellen in Form einer Rechtsverschiebung des Fluores-

zenz-Peaks erkennbar war. Der Anteil von Tieren aus den Transfer von Mosaiken und Mehrzellern mit unsicherem Fusionsergebnis, die einen Doppelpeak bei den DNA-Messungen zeigten, unterschied sich jeweils nicht signifikant von den Kontroll-embryonen.

Bei Betrachtung der einzelnen Tiere zeigte sich, daß nur Kaninchen aus dem Transfer von diploid-tetraploid-Mosaiken erhöhte DNA-Gehalte in mehr als drei ihrer untersuchten Organe aufwiesen. Zwei Tiere zeigten in vier von acht untersuchten Organen erhöhte DNA-Gehalte. In Tabelle 39 sind die Meßergebnisse der Tiere aufgelistet, von denen alle acht Organproben gemessen werden konnten. Die fehlenden Meßergebnisse von verschiedenen Organproben der anderen Tiere kamen durch Ausfälle bei der Probenaufbereitung oder der DNA-Gehalts-Messung zustande.

TAB. 39: DNA-Meßergebnisse von Tieren, bei denen acht Organproben erfaßt wurden

	Anzahl Tiere	DNA-Gehalt aller Organe nicht erhöht	erhöhter DNA-Gehalt in x Organen			
			1	2	3	4
Kontrollen	3	2	1	0	0	0
Tiere aus unsicherer Fusion	10	1	6	3	0	0
Tiere aus Mosaiktrans- fer	6	1	1	1	1	2

9 von 10 Tieren aus dem Transfer von Mehrzellern mit unsicherem Fusionsergebnis zeigten einen erhöhten DNA-Gehalt ihrer Zellen. Davon war bei 6 Tieren ein Organ betroffen und bei drei Tieren zeigte sich eine Erhöhung des DNA-Gehaltes in zwei Organen.

Von 6 Tieren aus dem Transfer von diploid-tetraploid-Mosaiken zeigte eines keine Abweichungen im DNA-Gehalt seiner Zellen, je ein Tier zeigte einen erhöhten DNA-Gehalt in einem, zwei und drei Organen. In zwei Tieren war der DNA-Gehalt in vier der acht erfaßten Organe erhöht.

4.3. ENUKLEATION FUSIONIRTER ZWEIZELLEMBRYONEN UND KULTUR VON FUSIONIERTEN ENUKLEIERTEN ZWEIZELLEMBRYONEN

4.3.1 E nukleation fusionierter Zweizellembryonen

Bei der E nukleation wurde einer der beiden Zellkerne von fusionierten Zweizellern der Maus entnommen.

Insgesamt wurden 1598 fusionierte Mäusezweizeller in die E nukleationsversuche einbezogen. Davon wurden 649 (41 %) erfolgreich enukleiert. 949 Embryonen (59 %) degenerierten während der E nukleation oder innerhalb einer Stunde danach.

Da die Embryonen vor Einbeziehung in die Versuche 15 bis 45 Minuten in Medium mit dem Zusatz von 7,5 µg/ml Cytochalasin D (E nukleationsmedium) vorbehandelt werden mußten und weil auch die E nukleation selbst in diesem Medium ausgeführt wurde, sollte die Eignung von Whitten-Medium und M 2 für E nukleationszwecke ausgetestet werden. Die E nukleationsergebnisse bei Verwendung dieser beiden Medien sind in Tabelle 40 zusammengestellt.

Die E nukleation fusionierter Zweizeller gelang bei 38 % der Embryonen in Whitten- und bei 43 % der Embryonen in M 2-Medium mit jeweils dem Zusatz von Cytochalasin D. Die E nukleationsrate war bei Verwendung von M 2 signifikant größer ($p < 0,05$) als bei Verwendung von Whitten-Medium. Gleichzeitig sank die Degenerationsrate von 62 % bei Verwendung von Whitten-Medium signifikant ($p < 0,05$) auf 57 % bei Verwendung von M 2.

TAB. 40: Ergebnisse der E nukleation von fusionierten Mäusezweizellern bei Verwendung verschiedener E nukleationsmedien

E nukleations-
medium

(+ 7,5 µg/ml Cyto D)	n	enukleiert	%	degeneriert	%
Whitten	520	196 ^a	38	324	62
M 2	1007	434 ^b	43	573	57
Summe	1527	630	41	897	59

a:b = $p < 0,05$ [#]

[#]Auswertung mit dem χ^2 -Test

4.3.2 In vitro Kultur fusionierter und enukleierter Zweizell-embryonen

Um die frühe Embryonalentwicklung der fusionierten und enukleierten Mäusezweizeller verfolgen zu können, wurden diese in Whitten-Medium kultiviert. Als Kontrollen dienten unbehandelte Mäusezweizeller, fusionierte Mäusezweizeller und fusionierte Mäusezweizeller, die über 20 Minuten in Whitten-Medium mit dem Zusatz von 7,5 µg/ml Cytochalasin D kultiviert wurden. In Tabelle 41 sind die Kulturergebnisse aufgezeigt.

TAB. 41: Ergebnisse der in vitro Kultur in Whitten-Medium von fusionierten und enukleierten Mäusezweizellembryonen im Vergleich zu Mäusezweizellembryonen mit verschiedenen Vorbehandlungen

Behandlung der Zweizeller	n	nicht		geteilt zu			
		geteilt	geteilt	ZZ	DZ+VZ	SZ+AZ	M+B
unbehandelt	182	60	122 ^a	0	56	10	56 ^e
	(%) [*]	33	67	0	31	5	31
fusioniert	522	297	225 ^b	88	34	4	99 ^f
	(%) [*]	57	43	17	6	1	19
fusioniert + Cyto D-vorbe- handelt	84	48	36 ^c	11	8	2	15 ^g
	(%) [*]	57	43	13	10	2	18
fusioniert + enukleiert	159	112	47 ^d	27	15	0	5 ^h
	(%) [*]	70	30	17	10	0	3

a:b = $p < 0,001$ [#]

e:g = $p < 0,05$

*: % bezogen auf die Gesamt-
zahl n

a:c = $p < 0,001$

e:h = $p < 0,01$

a:d = $p < 0,001$

f:h = $p < 0,001$

[#] Auswertung mit dem χ^2 -Test

b:d = $p < 0,01$

g:h = $p < 0,001$

e:f = $p < 0,01$

Gegenüber unbehandelten Zweizellern, von denen sich in vitro 67 % teilten und fusionierten und mit Cytochalasin D vorbehandelten Zweizellern, von denen sich 43 % teilten, war die Teilungsrate der fusionierten und enukleierten Zweizeller mit 30 % am kleinsten, unterschied sich jedoch nicht signifikant von der Teilungsrate der mit Cytochalasin D vorbehandelten fusionierten Zweizeller. 17 % der eingesetzten fusionierten und enukleierten Zweizeller teilten sich bis zum Zweizellstadium, 10 % bis zum Drei- und Vierzellstadium und 3 % bis zum Morula- oder Blastozystenstadium. Der Anteil der Embryo-

nen, die sich nach in vitro Kultur bis zum Blastozystenstadium geteilt hatten, war bei unbehandelten Zweizellembryonen mit 31 % am größten, gefolgt von 19 % Morulae- oder Blastozysten bei fusionierten und 18 % bei fusionierten und Cytochalasin D-vorbehandelten Zweizellern. Die Rate der Embryonen, die sich nach der Fusion und Cytochalasin D-Behandlung zu Morulae oder Blastozysten geteilt hatten war nicht signifikant verschieden von der Rate der Embryonen, die sich nach der Fusion zu Morulae oder Blastozysten geteilt hatten. Die Behandlung der fusionierten Zweizeller mit Cytochalasin D setzte demnach die Teilungsfähigkeit der Embryonen nicht herab. Deshalb muß die signifikant kleinere ($p < 0,001$) Rate an Morulae und Blastozysten (3 %) nach der in vitro Kultur fusionierter und enukleierter Zweizeller auf die Enukleation selbst zurückgeführt werden.

4.3.3 In vivo Kultur fusionierter und enukleierter Zweizellembryonen

Um die Entwicklung der fusionierten und enukleierten Mäusezweizeller vor der Implantation und bis über das Implantationsstadium hinaus verfolgen zu können, wurden 242 fusionierte enukleierte Zweizeller in insgesamt 18 Empfängertiere transferiert. Zwei der Empfängertiere wurden nach 3 Kulturtagen gespült und die wiedergefundenen Embryonen beurteilt. Die anderen Empfängertiere wurden alle drei Tage gewogen. Sobald die Körpergewichtszunahme stagnierte oder das Empfängertier an Gewicht verlor, wurde es getötet und auf Vorhandensein von Feten untersucht. Auf diese Weise ergaben sich je zwei in vivo Kulturen über 3, 8, 14, 15 und 19 Tage. Je eine in vivo Kultur erstreckte sich über 6, 7, 9, 10, 11, 12, 17 und 18 Tage.

Von den 242 transferierten Embryonen konnten 22 in insgesamt 5 Empfängertieren wiedergefunden werden. 18 der 22 wiedergefundenen Embryonen stammten aus in vivo Kulturen über drei

Tage. Sie unterteilten sich in 6 degenerierte Embryonen, 3 Zweizeller, 1 Vierzeller, 1 Morula und 7 Blastozysten. Ein normal entwickelter Fetus wurde am Tag 15 der Kultur neben 7 Resorptionsstellen in einem Empfängertier gefunden. Ein degenerierter Fetus wurde am Tag 17 und zwei degenerierte Feten wurden am Tag 19 der in vivo Kultur gefunden. Die Wiederfindungsrate der Embryonen betrug 9 % (22/242). 41 % der wiedergefundenen Embryonen waren degeneriert.

In Tabelle 42 sind die Transferergebnisse der Tiere zusammengefaßt, die aufgrund ihrer konstanten Körpergewichtszunahme bis zum errechneten Wurftermin kamen.

TAB. 42: Ergebnisse aus Transfers von fusionierten und enukleierten Zweizellembryonen der Maus

Empf.- Syn-					
Num-	chroni-	transferierte Embryonen		geborene Tiere aus	
mer	tät*	fus.+en.ZZ	Kontr.	fus.+en.ZZ	Kontr.
1	- 24 h	17	-	3	-
2	- 24 h	6	3 EZ	2	1
3	- 24 h	16	8 EZ	6	5
4	- 24 h	14	6 EZ	0	1
5	- 24 h	10	8 ZZ	0	5
6	- 24 h	5	6 VZ	0	5
7	synchron	24	-	1	-
8	- 24 h	28	-	8	-
Summe		120	31	20	17

* Empfängersynchronität bezogen auf die fusionierten enukleierten Zweizeller

Die Überlebensrate der fusionierten und enukleierten Zweizeller lag bei 17 % (20/120), die der Kontrollembrionen lag bei 55 % (17/31). Im χ^2 -Test erwies sich der Unterschied in den Überlebensraten als signifikant ($p < 0,001$). Bei Transfers ohne gleichzeitige Übertragung von Kontrollembrionen betrug die Überlebensrate der fusionierten und enukleierten Zweizeller 17 % (12/69), mit Übertragung von Kontrollembrionen lag die Überlebensrate der Embryonen bei 16 % (8/51). Die Überlebensraten unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

Sowohl Empfängertiere, die in ihrem Zyklus synchron mit den transferierten fusionierten und enukleierten Zweizellern und Kontrollen waren, als auch Empfängertiere, deren Zyklus 24 h hinter dem entsprechenden Stadium der Zweizeller zurücklag, brachten Tiere aus fusionierten und enukleierten Zweizellern und Tiere aus Kontrollembrionen zur Welt.

5. DISKUSSION

5.1 Zweizellembryonen

5.1.1 Elektrofusion

Bislang lagen in der Literatur keine Aussagen vor, wie sich die Superovulation, die Dauer des Alignments und der Anteil des Duty cycles während der Dielektrophorese auf das Ergebnis der Fusion von Zweizellembryonen auswirken.

Die Fusionsrate bei Verwendung von 2 Fusionspulsen mit der Pulsdauer von je 70 μ s und der Feldspannung von 0,60-0,69 kV/cm lag bei Mäusezweizellern aus superovulierten Spender-tieren bei 85 %, bei Zweizellern aus normal angepaarten Spen-dertieren bei 88 %. Der Unterschied war nicht signifikant und unterstrich, daß die Fusionsrate nicht davon beeinflußt wurde, ob die zu fusionierenden Embryonen aus normal ange-paarten oder aus superovulierten Spendertieren stammten.

Bei der Fusion von Mäusezweizellembryonen zeigte sich, daß die Fusionsrate signifikant größer war, wenn statt einer Alignmentdauer von 10 bis 20 Sekunden die Alignmentdauer un-ter 10 Sekunden lag. Gleichzeitig fiel auf, daß bei einer Alignmentdauer von über 20 Sekunden signifikant mehr Embryo-nen degenerierten. Da alle Fusionen in Medium mit geringer Leitfähigkeit ausgeführt wurden, kann eine Störung des Align-ments durch Ionen, die Turbulenzen im Fusionsmedium verursa-chen, ausgeschlossen werden. Die Ursache für die Störung des Fusionsprozesses durch langer andauerndes Alignment muß also innerhalb der Embryonen liegen. Nach ZIMMERMANN (1986) kann ein Wechselstromfeld mit Membrankomponenten in Wechselwirkung treten, was die Umverteilung der Membranproteine und, so wird vermutet, auch die Umverteilung der Membranlipide zur Folge hat. Bei lang andauernder Einwirkung des Wechselfeldes werden große Membranareale von diesen Umverteilungen betroffen. Wer-

den diese Areale zu groß, so können sie nach Abklingen des Wechselstromfeldes nicht wieder regeneriert werden, weil die Umverteilungen irreversibel geworden sind. Als Konsequenz ergibt sich einerseits der ausbleibende Fusionsprozeß, da keine Membranbrücken zwischen den Blastomeren ausgebildet werden können und andererseits die Degeneration der Blastomeren, da die Membranen als regulierende Faktoren des Austausches von Zelle und Umgebungsmedium ausfallen.

Kaninchenembryonen zeigten bei bis über 20 Sekunden andauerndem Alignment keine Degenerationserscheinungen. Der Grund dafür scheint eine höhere Toleranz gegenüber elektrischen Feldern zu sein. Die Ursache dafür könnte in der im Vergleich zu Mäusen dickeren Zona pellucida und der zusätzlichen Muzinschicht liegen. Die Zona pellucida setzt bei der Fusion von Mäusezweizellern die benötigte Durchbruchsspannung herauf (BERG, 1983).

Die Ausrichtung der Zweizellembryonen für die Elektrofusion wurde von BERG (1982; 1983), KUBIAK und TARKOWSKI (1985) und OZIL und MODLINSKI (1986) mechanisch ausgeführt. In eigenen Versuchen wurde dafür von der Dielektrophorese Gebrauch gemacht. Ziel war es, neben der Ausrichtung im elektrischen Feld einen engeren Membrankontakt und eine größere Membrankontaktzone zwischen den Blastomeren zu schaffen, um auf diese Weise höhere Fusionsausbeuten zu erzielen. Um die Auswirkungen der Dielektrophorese auf das Fusionsergebnis zu überprüfen, wurde der Duty cycle, also der Zeitanteil, in dem das Wechselstromfeld während des Alignments eingeschaltet ist, zwischen 2 % und 100 % variiert.

In den Versuchen zeigte sich, daß die Fusionsrate bei Mäusezweizellern signifikant von 52 % auf 76 % erhöht werden kann, wenn statt eines Duty cycles von 2 % ein Duty cycle von 100 % verwendet wird. Dieses Ergebnis widerspricht dem Ergebnis von KUBIAK und TARKOWSKI (1985), die durch Anlegen eines Wechselstromfeldes vor Auslösung der Fusionspulse keine Steige-

rungen der Fusionsraten erzielen konnten. Auch bei den Kaninchenembryonen konnte die Fusionsrate auf diese Weise, wenn auch nicht signifikant, um 6 % erhöht werden. Bei Schweinezweizellern sank bei geringem Versuchsumfang die Fusionsrate bei Steigerung des Duty cycles (nicht signifikant) von 75 % auf 72 %.

Trotz bereits vorhandenen Membrankontaktes bei Zweizellembryonen innerhalb der Zona pellucida wirkte sich das Anlegen eines Wechselstromfeldes günstig auf die Fusionsraten aus. Dies kann dadurch erklärt werden, daß durch Anlegen von Wechselstrom Dipole innerhalb der Blastomeren entstehen, die die gegenseitige Anziehung der Blastomeren bewirken und die Zellmembranen der Blastomeren in engeren Kontakt bringen. Die Anziehung der Blastomeren untereinander führt darüberhinaus zu einer Abflachung und Vergrößerung der Membrankontaktzone zwischen den beiden Blastomeren. Bei Auslösung der elektrischen Feldpulse steht somit eine größere Membranfläche zur Verfügung, in der sich Zytoplasmakanäle zwischen den Blastomeren ausbilden können.

Ein Einfluß des Mediums, in welchem die Embryonen vor und unmittelbar nach den Fusionspulsen aufbewahrt werden, auf die Fusion von Zweizellembryonen ist bisher nicht beschrieben worden. Bei der Fusion von Mäusezweizellern zeigte sich, daß bei Verwendung von Whitten-Medium vor und nach den Fusionspulsen signifikant höhere Fusionsraten erzielt werden konnten, als bei der Kombination von M 2 und Whitten-Medium oder bei alleiniger Verwendung von M 2 oder PBS + 20 % FKS. Diese Tatsache war insofern überraschend, als während der Elektrofusion die Kulturschalen mit Whitten-Medium aus technischen Gründen bis zu 30 Minuten auf Warmeplatten in Raumatmosphäre aufbewahrt werden mußten. Um physiologische pH-Werte für die Embryonen aufrecht zu erhalten, muß Whitten-Medium mit 5 % CO_2 in Luft oder 5 % CO_2 , 5 % O_2 und 90 % N_2 begast werden. Demnach war bei Versuchsbeginn davon ausgegangen worden, daß die Verwendung von M 2 und PBS + 20 % FKS geeigneter sei. Im

Versuchsablauf fiel jedoch auf, daß der Fusionsprozeß der Embryonen nach Auslösung der Fusionspulse und unmittelbarem Umsetzen in Whitten-Medium schneller abgeschlossen war als in M 2 oder PBS + 20 % FKS. Zweizellembryonen in Whitten-Medium waren spätestens nach 15 Minuten zu einer runden Zelle verschmolzen. In M 2 dauerte dies bis zu 45 Minuten und in PBS + 20 % FKS bis zu einer Stunde. Die Degenerationsraten waren bei alleiniger Verwendung von Whitten-Medium signifikant größer als die Degenerationsraten bei alleiniger Verwendung von M 2.

Es zeigte sich, daß von den in M 2 aufbewahrten Embryonen zwar weniger fusionieren, die nicht fusionierten jedoch in geringerem Grade degenerieren als nicht fusionierte Zweizeller in Whitten-Medium. Whitten-Medium scheint demnach die Zellmembranen gegenüber elektrischen Pulsen empfindlicher zu machen. Als Konsequenz daraus fusionieren und degenerieren mehr Embryonen. M 2 hätte demnach von den getesteten Medien die membranstabilisierendste Wirkung, da bei geringerer Fusionsrate auch die wenigsten Embryonen degenerieren. Die geringste Eignung hatte PBS + 20 % FKS als alleiniges Medium für die Aufbewahrung der Embryonen vor und nach den Fusionspulsen. Die Fusionsrate der Zweizeller war gegenüber Whitten-Medium und M 2 am geringsten und die Degenerationsrate am größten.

Bei der Fusion von Kaninchenzweizellembryonen waren die Fusionsraten bei alleiniger Verwendung von BSM 2 und PBS + 10 % FKS mit 41 % und 22 % nicht signifikant unterschiedlich. Die Degenerationsrate war jedoch bei Verwendung von BSM 2 signifikant niedriger als bei Verwendung von PBS + 10 % FKS. Somit war auch bei Kaninchen die Anwendung von PBS + 10 % FKS als Medium vor und nach der Fusionsauslösung weniger geeignet. Dies erklärt den geringen Versuchsumfang des Einsatzes von PBS + 10 % FKS: nachdem die schlechte Eignung dieses Mediums erkannt war, wurde fortan ausschließlich von BSM 2 Gebrauch gemacht.

Bei Variation der Pulsanzahl von einem bis vier Pulsen war kein Einfluß auf die Fusionsraten von Mäusezweizellern zu erkennen. Die Fusionsraten bei Verwendung von einem, drei oder vier Fusionspulsen unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Die höchste Fusionsrate lag mit 4 Fusionspulsen bei 84 %, die niedrigste mit 5 Fusionspulsen bei 50 %. Bei Steigerung der Pulsanzahl auf sieben, acht und neun Pulse jedoch nahmen die Fusionsraten bis auf 29 % ab. Bei Betrachtung der Degenerationsraten war mit Erhöhung der Pulsanzahl ein stetiger Anstieg von 3 % degenerierten Embryonen bei Verwendung eines Fusionspulses bis zu 23 % degenerierten Embryonen bei Verwendung von neun Fusionspulsen festzustellen. Demnach war die Pulsanzahl in Bereichen von einem bis sechs Fusionspulsen bezüglich der Fusionsraten von untergeordneter Bedeutung, bei Betrachtung der Degenerationsraten jedoch ist der Verwendung von einem oder zwei Fusionspulsen der Vorzug zu geben. In der Literatur sind keine Versuche beschrieben, die den Einfluß der Anzahl verwendeter Fusionpulse auf die Fusionrate von Mäusezweizellembryonen aufzeigen.

OZIL und MODLINSKI (1986) variierten die Pulsanzahl bei der Fusion von Kaninchenzweizellern zwischen einem und vier Pulsen und stellten fest, daß die Fusionsraten bei vier Pulsen gering über denen bei Verwendung von einem Puls lagen. Die maximale Fusionsrate lag mit einem Puls bei 85 %, mit vier Pulsen dagegen bei 88,4 %. Ebenso lag die Degenerationsrate der Zweizeller bei Verwendung von vier Pulsen um 2,5 % bis 6,2 % über den Degenerationsraten von Zweizellern, die mit einem Fusionspuls behandelt wurden. In eigenen Versuchen konnte bestätigt werden, daß die Fusionsrate und Degenerationsrate von Kaninchenzweizellern mit Steigerung der Pulsanzahl ansteigt. So fusionierten bei Verwendung von 3 Pulsen 37% der Zweizeller, bei Verwendung von 7 Fusionspulsen dagegen 47 % der Zweizeller. Die Degenerationsrate stieg dabei von 11 % auf 27 % an.

Bei Variation der Pulsdauer stellten KUBIAK und TARKOWSKI (1985) fest, daß die Fusionsraten von Mäusezweizellembryonen mit Verlängerung der Pulsdauer ansteigen. Sie erzielten in elektrolytffreier Fusionslösung bei Pulsen der Dauer 20 μ s Fusionsraten von 20 %, bei 50 μ s 61 %, bei 100 μ s 57 % und bei 250 μ s 88 %. In den eigenen Versuchen wurde die Pulsdauer in engeren Grenzen bis zu einer Maximallänge von 90 μ s variiert. Bei 30 μ s-Pulsen lag die Fusionsrate in eigenen Versuchen bei 15 % und unterschied sich damit nur gering von der 20 %igen Fusionsrate bei Pulsen von 20 μ s-Dauer aus den Versuchen von KUBIAK und TARKOWSKI (1985). Die Fusionsrate bei Pulsen von 60 μ s lag in den eigenen Versuchen mit 89 % höher als die 61 %ige Fusionsrate von KUBIAK und TARKOWSKI (1985), die sie mit vergleichbaren Pulslängen von 50 μ s erzielten. Im Gegensatz zu der in der Literatur beschriebenen Zunahme der Fusionsraten bei weiterer Steigerung der Pulsdauer war in den eigenen Versuchen ein Rückgang der Fusionsraten von 75 % auf 63 % zu verzeichnen, wenn die Pulsdauer von 70 μ s auf 80 μ s verlängert wurde. Bei Pulslängen von 90 μ s wurden 63 % der Zweizeller fusioniert, womit die Fusionsrate über der von KUBIAK und TARKOWSKI (1985) lag, die mit Pulsen der Dauer von 100 μ s Fusionsraten von 57 % erzielt hatten. Maximale Fusionsausbeuten von 100 % erreichten KUBIAK und TARKOWSKI (1985) bei Verwendung von Fusionspulsen der Dauer von 1000 μ s. Dabei muß jedoch berücksichtigt werden, daß diese Pulslänge mit nur 15 Zweizellembryonen ausgetestet wurde und die sich daraus ergebende Prozentzahl nur bedingt für Vergleiche herangezogen werden kann.

Bei der Fusion von Kaninchenzweizellern stellten OZIL und MODLINSKI (1986) fest, daß die Fusionsraten mit ansteigender Pulsdauer ab- und die Degenerationsraten zunahmen. Dies konnte in eigenen Versuchen bestätigt werden. In den Versuchen von OZIL und MODLINSKI (1986) nahm die Fusionsrate bei Steigerung der Pulsdauer von 35 μ s auf 100 μ s von 89,6 % auf 86,6 % ab, in eigenen Versuchen wurde die Fusionsrate bei

Steigerung der Pulsdauer von 50 auf 80 μ s von 50 % auf 30 % verringert. Die Degenerationsrate der Kaninchenzweizeller nahm in den Versuchen von OZIL und MODLINSKI (1986) von 0 % bei Pulsen der Dauer 35 μ s auf 15,4 % bei Pulsen der Dauer von 1000 μ s zu. Dagegen stieg die Degenerationsrate in eigenen Versuchen von 28 % bei Pulsen der Dauer 50 μ s auf 39 % bei Pulsen der Dauer von 80 μ s.

Die Fusionsraten von Schweinezweizellembryonen nahmen mit zunehmender Pulsdauer ebenfalls ab, und die Degenerationsraten nahmen zu. Dies entsprach den Ergebnissen von Kaninchenembryonen. In der Literatur sind vergleichbare Versuche mit Schweinezweizellembryonen nicht beschrieben.

Bei Betrachtung des Einflusses der Pulsstärke fiel auf, daß die höchste Fusionsrate bei Mäusezweizellern mit 86 % bei Feldspannungen von 0,60-0,69 kV/cm erzielt wurde und daß die Fusionsraten bei weiterer Erhöhung der Feldspannung rückläufig waren. KUBIAK und TARKOWSKI (1985) dagegen konnten bei Verwendung einer Feldspannung von 0,60 kV/cm keinen von 35 Zweizellembryonen fusionieren, bei Steigerung der Feldstärke auf 0,80 kV/cm erzielten sie Fusionsraten von 35 % und bei Feldstärken von 1,0 kV/cm Fusionsraten von 67 %. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz könnte der nicht genau bestimmte Elektrodenabstand bei den Versuchen von KUBIAK und TARKOWSKI (1985) sein. Sie benützten zwei gegeneinander bewegliche Elektroden, die sie zu den zu fusionierenden Zweizellern vorschoben. Den Elektrodenabstand beschrieben sie als 'etwa' 100 μ m. Da beispielsweise die Abweichung des geschätzten Elektrodenabstandes mit 120 μ m gegenüber dem tatsächlichen Elektrodenabstand mit 100 μ m bereits Abweichungen der Feldspannung von 0,17 kV/cm nach sich zieht, können größere Abweichungen bei der tatsächlichen Feldspannung in den Versuchen von KUBIAK und TARKOWSKI (1985) nicht ausgeschlossen werden. In eigenen Versuchen konnte durch die Verwendung von Fusionskammern, in denen beide Elektroden fixiert waren, der

exakte Elektrodenabstand durch Messung unter einem Mikroskop bestimmt werden.

Bei Kaninchen- und Schweinezweizellern war durch die Erhöhung der Feldspannung ein Ansteigen der Fusionsraten zu verzeichnen. Für die Fusion von Schweinezweizellern stehen keine Literaturstellen für Vergleiche zur Verfügung.

OZIL und MODLINSKI (1986) beschrieben bei der Fusion von Kaninchenzweizellern ebenfalls das Ansteigen der Fusionsraten mit steigender Feldspannung. So fusionierten 27,3 % der Zweizeller bei einer Pulsstärke von 1,0 kV/cm und 85 % der Zweizeller bei einer Pulsstärke von 3,0 kV/cm. In eigenen Versuchen stieg die Fusionsrate von 36 % bei 0,60 bis 0,69 kV/cm auf 44 % bei 0,70 bis 0,79 kV/cm an. Auffallend waren die wesentlich höheren Pulsstärken, die OZIL und MODLINSKI (1986) in ihren Versuchen verwendeten. In eigenen Versuchen betrug die Degenerationsrate der Embryonen bei Pulsstärken von 0,70 bis 0,79 kV/cm bereits 28 %.

Bei gleichzeitiger Betrachtung von Pulsanzahl, Pulsdauer und Pulsstärke war bei der Fusion von Mäusezweizellembryonen festzustellen, daß bei geringerer Feldspannung (0,30-0,59 kV/cm) größere Fusionsraten erzielt werden konnten, wenn drei und mehr Pulse verwendet wurden. Zwei Fusionspulse brachten bei dieser Feldspannung und einer Pulsdauer von 70 μ s mit 69% geringere Fusionsraten mit sich als drei oder vier Fusionspulse (69 % bzw. 84 %).

Bei höherer Feldspannung (0,60-0,89 kV/cm) und gleicher Pulsdauer von 70 μ s nahmen die Fusionsraten mit ansteigender Pulsanzahl ab. So wurde eine maximale Fusionsrate von 95 % bei einem Fusionspuls erreicht. Die Verwendung von zwei und drei Fusionspulsen reduzierte die Fusionsraten auf 85 bzw. 75%.

Bei sehr hoher Feldspannung (0,90-1,19 kV/cm) waren die Fusionsraten allgemein niedriger als bei niedrigeren Feldspannungen, unabhängig davon, wieviele Pulse verwendet wurden.

Bei der Verwendung von einem und zwei Fusionspulsen war bei gleicher Feldspannung (0,60-0,89 kV/cm) zu beobachten, daß bei Steigerung der Pulsdauer von 70 über 80 auf 90 μ s die Fusionsraten kontinuierlich abnahmen. Demnach waren bei dieser Feldstärke kürzere Pulse effizienter als längere Pulse.

Geringe Pulsanzahlen brachten bei geringen Fusionsraten erhöhte Raten an nicht fusionierten Embryonen mit sich, während hohe Pulsanzahlen bei geringen Fusionsraten hohe Degenerationsraten erwarten ließen. Mit ansteigender Pulsanzahl konnten hohe Fusionsraten durch Reduktion der Feldspannung erzielt werden.

In eigenen Vorversuchen (CLEMENT et al., 1988) war bei Mäusezweizellern eine maximale Fusionsrate von 90 % (37/41) erzielt worden, wenn vier Fusionspulse mit der Dauer von 70 μ s und der Pulsstärke von 0,53 bis 0,94 kV/cm verwendet wurden. Die Ergebnisse sind wegen des kleinen Versuchsumfanges und der angegebenen großen Spanne bei der Pulsstärke mit der vorliegenden Arbeit nur eingeschränkt vergleichbar. Durch umfangreicheres Zahlenmaterial konnte festgestellt werden, daß bei Verwendung von vier Fusionspulsen die Fusionsraten bei 87% lagen, wenn die Pulsstärke auf 0,30 bis 0,59 kV/cm eingeschränkt war und daß die Fusionsrate mit Steigerung der Pulsstärke auf 0,60 bis 0,89 kV/cm auf 79 % sank.

KUBIAK und TARKOWSKI (1985) beschrieben, daß bei Verwendung von zwei Fusionspulsen mit der Pulsdauer von 50 μ s und der Pulsstärke von 0,60 kV/cm keiner der Mäusezweizeller fusionierte, bei Pulsstärken von 0,80 kV/cm dagegen 35 % fusionierten. Bei Zusammenfassung dieser Ergebnisse ergibt sich somit für Pulsstärken von 0,60 bis 0,80 kV/cm eine Fusionsrate von 17,5 %. Damit lag die Fusionsrate der vorliegenden Ar-

beit mit 56 % fusionierten Zweizellern bei Verwendung von zwei Fusionspulsen mit der Pulsdauer von 50 μ s und der Pulsstärke von 0,60 bis 0,89 kV/cm deutlich über der von KUBIAK und TARKOWSKI (1985) ermittelten Fusionsrate. Eine mögliche Erklärung könnte auch hier der von KUBIAK und TARKOWSKI (1985) nicht exakt bestimmte Elektrodenabstand liefern.

Übereinstimmend mit den Versuchen von OZIL und MODLINSKI (1986) nahmen die Fusionsraten von Kaninchenzweizellern bei Verwendung von bis zu vier Fusionspulsen mit steigender Pulsstärke zu. Die maximale erzielte Fusionsrate von 89,6 % (43/48) lag bei den Versuchen von OZIL und MODLINSKI (1986) deutlich über der bei 54 % (14/26) liegenden maximalen Fusionsrate der vorliegenden Arbeit. Dies kann auf die geringen Pulsstärken zurückgeführt werden, die in den eigenen Versuchen maximal 1,59 kV/cm betrugen. OZIL und MODLINSKI (1986) dagegen testeten Pulsstärken von 1,0 bis 3,0 kV/cm aus. Die in eigenen Versuchen zuvor beschriebenen Fusionsraten bis zu 71 % (CLEMENT et al., 1988) waren durch Zusammenfassung von Gruppen mit kleinem Versuchsumfang (weniger als 10 Embryonen) und großer Variation der Pulsstärke (0,58-1,00 kV/cm) erreicht worden.

Bei Schweinezweizellern zeigte sich in den Fusionsversuchen, daß selbst bei einer hohen Anzahl von Pulsen durch Steigerung der Pulsstärken bis zu 1,50-1,89 kV/cm die Fusionsraten erhöht werden können. Somit waren Schweinezweizeller hohen Feldstärken gegenüber weniger empfindlich als Mäusezweizeller.

Auffallend war bei Mäuse-, Kaninchen- und Schweinezweizellern, daß die Fusionsraten der Embryonen teilweise sehr stark vom Spendertier abhingen. Diese Beobachtungen stimmen mit den von KUBIAK und TARKOWSKI (1985) und OZIL und MODLINSKI (1986) beschriebenen Beobachtungen überein. Beispiele für die unterschiedlichen Empfindlichkeiten von Embryonen verschiedener Herkunft sind in Tabelle 43 gegeben. Die Fusionsversuche wur-

TAB. 43: Beispiele für je nach Herkunft unterschiedliche Empfindlichkeiten von Mäusezweizellembryonen gegenüber elektrischen Pulsen

Embryonen- spender	n	fusio- niert		nicht fusion.		degene- riert		Fusions- parameter
		%		%		%		
Maus 1	12	3	25	9	75	0	0	4 Pulse je 80 μ s
Maus 2	13	12	92	1	8	0	0	bei 1,00 kV/cm
Maus 1	21	1	5	20	95	0	0	3 Pulse je 70 μ s
Maus 2	29	23	79	6	21	0	0	bei 0,76 kV/cm
Maus 3	42	18	43	21	50	3	7	
Maus 1	30	7	23	23	77	0	0	2 Pulse je 70 μ s
Maus 2	26	22	85	4	15	0	0	bei 1,0 kV/cm

den jeweils innerhalb von 20 Minuten in derselben Fusionskammer und demselben Fusionsmediumstropfen ausgeführt.

Für die unterschiedlichen Empfindlichkeiten müssen genetische Unterschiede verantwortlich gemacht werden. Als Konsequenz wird deutlich, daß bei Berücksichtigung großer Embryonenzahlen Fusionsraten von 100 % nicht erreicht werden können.

5.1.2 Kultur fusionierter Zweizellembryonen

Durch die erfolgreiche Fusion von Zweizellern entstehen tetraploide Embryonen. Die Tetraploidie wurde von KUBIAK und TARKOWSKI (1985) in allen untersuchten Blastozysten, die sich aus durch Elektrofusion erstellten tetraploiden Zweizellembryonen der Maus entwickelt hatten, nachgewiesen. Bei Kaninchenzweizellern beschrieben OZIL und MODLINSKI (1986), daß

bei 72,3 % der fusionierten Embryonen die Zellkerne in engen Kontakt traten und sich die Embryonen danach in zwei gleich große Blastomeren teilten. Bei 27,7 % der fusionierten Zweizeller schoben sich bei der Fusion entstandene kleine Membranesikel zwischen die Zellkerne, die dadurch nicht mehr in Kontakt treten konnten. Diese fusionierten Zweizeller teilten sich in drei oder vier Zellen. Es wurde vermutet, daß diese Embryonen diploid blieben, und daß die zu Zweizellern geteilten Embryonen tetraploid waren. Widersprüchlich war dabei jedoch, daß sich zum Teil auch fusionierte Zweizeller, deren Zellkerne in engen Membrankontakt getreten waren, zu Drei- oder Vierzellern teilten. Von untersuchten Embryonen und Feten, die sich aus fusionierten Kaninchenzweizellern entwickelt hatten, zeigten nicht alle einheitlich Tetraploidie. Ob dies aufgrund fehlender Kernfusionen zustande gekommen war oder ob dies die Folge eines unstabilen Zustandes des vierfachen Chromosomensatzes war, der sich bei mehreren Zellteilungen wieder reduziert hatte, wurde nicht beschrieben.

Bei der in vitro Kultur fusionierter Mäusezweizeller zeigte sich in eigenen Versuchen, daß sich 43 % aller tetraploiden Embryonen und 67 % aller unbehandelten Kontrollembrionen zumindest einmal teilten. Auffallend war, daß sich 39 % der sich teilenden fusionierten Embryonen nur bis zum Zweizellstadium, dagegen 46 % der Kontrollembrionen bis zum Drei- und Vierzellstadium teilten. Unter Berücksichtigung der insgesamt vollzogenen Zellteilungen entspricht jedoch das Zweizellstadium fusionierter Zweizeller dem Drei- und Vierzellstadium von Kontrollembrionen. Signifikant mehr fusionierte Zweizeller stellten ihre Teilung nach vollzogener zweiter Zellteilung ein, als dies bei Kontrollembrionen der Fall war. Die Entwicklungsrate bis zum Morula- oder Blastozystenstadium war bei tetraploiden Zweizellern signifikant kleiner als bei Kontrollembrionen. In bezug auf die geteilten Embryonen jedoch unterschied sich die Rate an Morulae und Blastozysten von fusionierten Embryonen mit 44 % nicht von dem Ergebnis von Kontrollembrionen mit 46 %. Demnach bestand in diesen

Versuchen zwischen den Entwicklungsraten der sich teilenden fusionierten Embryonen und der Kontrollembrionen kein Unterschied.

Die Teilungsrate fusionierter Mäusezweizeller war mit 43 % nahezu gleich groß wie die Teilungsrate fusionierter Zweizeller (42 %) aus eigenen früheren Versuchen (CLEMENT et al., 1988). Dagegen lag die Teilungsrate von Kontrollembrionen in der vorliegenden Arbeit mit 66 % über der in den Vorversuchen erreichten Teilungsrate von 56 %. Der Anteil an sich teilenden fusionierten Zweizellern, die sich bis zum Morula- und Blastozystenstadium weiterentwickelten, übertraf den Anteil aus früheren Versuchen (CLEMENT et al., 1988) um 34 %, den von Kontrollembrionen um 9 %. Die Gründe liegen zum einen in dem noch geringeren Versuchsumfang der früheren Versuche, die nur die Kultur von 150 fusionierten und 113 Kontrollembrionen beinhalteten. Demgegenüber wurden in der vorliegenden Arbeit die Ergebnisse von 541 fusionierten und 207 Kontrollembrionen berücksichtigt. Zum andern sind die in der vorliegenden Arbeit höheren Teilungsraten auf einen routinierteren Umgang mit den Embryonen während der Embryogewinnung, Elektrofusion und Embryonenkultur zurückzuführen.

KUBIAK und TARKOWSKI (1985) beschrieben, daß sich die durch Elektrofusion erstellten tetraploiden Mäuseembryonen in ihrer Entwicklung nicht von tetraploiden Embryonen unterschieden, die durch andere fusionsinduzierende Agenzien oder durch Cytochalasin B erstellt worden waren. Neben der vorwiegend im Vierzellstadium beginnenden Kompaktierung wiesen die Embryonen im Blastozystenstadium eine durchschnittlich um die Hälfte kleinere Zahl der Zellen der inneren Zellmasse (ICM) auf als diploide Kontrollembrionen. Angaben zu den Teilungsraten von in vitro kultivierten tetraploiden Zweizellern wurden von KUBIAK und TARKOWSKI (1985) nicht gemacht.

In Versuchen von SNOW (1973) teilten sich bei in vitro Kultivierung in Whitten-Medium 40 % bis 75 % der mit Hilfe von Cy-

tochalasin B erstellten tetraploiden Mäuseembryonen bis zum Blastozystenstadium. Dagegen teilten sich in eigenen Versuchen nur 19 % der durch Elektrofusion erstellten tetraploiden Embryonen in Whitten-Medium bis zum Blastozystenstadium. Als mögliche Ursachen muß zum einen an eine durch die Elektrofusion bedingte herabgesetzte Teilungsfähigkeit der Embryonen gedacht werden. Zum anderen könnte die Ursache die unterschiedliche Begasung der Embryonen sein. SNOW (1975) verwendete 10 % CO₂ in Luft, während die Embryonen aus Elektrofusion mit 5 % CO₂ in Luft oder mit 5 % CO₂, 5 % O₂ und 90 % N₂ begast wurden. Da Whitten-Medium mit Bicarbonat gepuffert ist, verhindert die Begasung mit CO₂ das Umschlagen des Mediums in den basischen Bereich. Möglicherweise war der CO₂-Gehalt bei Begasung der fusionierten Zweizellembryonen nicht hoch genug.

Bei Berücksichtigung der Teilungsfähigkeit fusionierter Zweizeller der Maus war die Gesamteffektivität bei Verwendung von drei Fusionspulsen mit der Pulsdauer von 70 µs und der Feldstärke von 0,30-0,59 kV/cm am größten. Von 84 % fusionierten Embryonen teilten sich 66 %. 37 % teilten sich bis zum Morula- und Blastozystenstadium. Die Rate geteilter fusionierter Embryonen lag damit nach Fusion und Kultur bei 55 %, die Rate an Morulae und Blastozysten bei 31 %. Bei Verwendung eines Fusionspulses mit der Dauer von 70 µs und der Pulsstärke von 0,60-0,89 kV/cm fusionierten zwar mit 95 % mehr Embryonen, nur 33 % der fusionierten Embryonen teilten sich aber anschließend weiter und 18 % erreichten das Morula- und Blastozystenstadium. Die Rate geteilter fusionierter Zweizeller lag damit nach Fusion und Kultur bei 31 %. Die Rate an Morulae und Blastozysten war mit 17 % deutlich geringer als bei Verwendung von drei Fusionspulsen. Bei Betrachtung der Gesamteffektivität muß demnach berücksichtigt werden, daß Fusionsparameter, die hohe Fusionsraten mit sich bringen, gleichzeitig die Entwicklungsfähigkeit der Embryonen herabsetzen können.

Bei der in vitro Kultur von 17 durch Elektrofusion erstellten tetraploiden Kaninchenembryonen teilten sich vier Embryonen bis zum Morulastadium. OZIL und MODLINSKI (1986) erhielten ebenfalls Morulae aus tetraploiden Kaninchenembryonen, die sich bei weiterer Kultivierung bis zu Blastozysten weiterentwickelten. Aufgrund des kleinen Versuchsumfanges können die eigenen Versuchsergebnisse nicht mit den von OZIL und MODLINSKI (1986) beschriebenen Versuchsergebnissen verglichen werden. Dennoch sei bemerkt, daß sich bis zu 83,9 % der von OZIL und MODLINSKI (1986) fusionierten Zweizellembryonen zu expandierten Blastozysten weiterentwickelt hatten, und daß sich die tetraploiden Embryonen in ihrer Entwicklungsfähigkeit von Kontrollembrionen nicht unterschieden.

Die in vitro Kultur fusionierter Schweinezweizeller zeigte, daß die Teilungsraten tetraploider Embryonen geringer sind als die von Kontrollembrionen. Tetraploide Schweinezweizeller entwickelten sich wie die Kontrollembrionen maximal zum Vierzeller. Der Grund für die allgemein schlechten Entwicklungsraten war das Fehlen eines geeigneten Kulturmediums für Zweizellembryonen des Schweines.

Von 34 wiedergefundenen transferierten fusionierten Mäusezweizellern hatten sich nach zwei- bis viertägiger in vivo Kultur 14 % zu Morulae und Blastozysten entwickelt. Diese Entwicklungsrate unterschied sich nicht signifikant von der Entwicklungsrate der gleichzeitig transferierten Kontrollembrionen. Daraus kann geschlossen werden, daß sich die Entwicklungsraten von fusionierten Zweizellern und Kontrollembrionen in der in vivo Kultur im Gegensatz zur in vitro Kultur nicht unterscheiden. Als Erklärung sei bemerkt, daß die in vivo Kultur ideale Kulturbedingungen für die Embryonen mit sich bringt, die in vitro nie vollständig erreicht werden können. Mangel in der in vitro Kultur wirken sich demnach in stärkerem Maße auf die durch die Elektrofusion manipulierten Embryonen aus.

In zwei Empfängertieren, in die fusionierte Zweizeller und Kontrollembrionen transferiert worden waren, konnten nach 17- und 19-tägiger in vivo Kultur keine Feten oder Resorptionsstellen gefunden werden. Da sich auch die Kontrollembrionen nicht entwickelt hatten, sind die Gründe in technischen Fehlern bei den Transfers oder in der Verwendung von nicht scheinträchtigen Empfängertieren zu vermuten.

Nach Abwarten des Geburtstermines wurden nach Transfer von 122 fusionierten Zweizellembryonen und 79 Kontrollembrionen in acht Empfängertiere 21 Kontrolltiere in vier Würfen geboren. Aus der Fusion von Zweizellembryonen kam kein Tier zur Welt. Da sich in vier Empfängertieren die Kontrollembrionen entwickeln konnten, sind hier Ausfälle beim Transfer oder die Verwendung von nicht scheinträchtigen Empfängertieren ausgeschlossen. Daraus kann gefolgert werden, daß die tetraploiden Embryonen in ihrer Entwicklungsfähigkeit beeinträchtigt waren. Diese Vermutung stimmt mit den Versuchen von KUBIAK und TARKOWSKI (1985) überein, die am Tag 16 und 20 in zwei Empfängertieren insgesamt 12 in Resorption befindliche Feten fanden, nachdem sie 52 fusionierte Mäusezweizeller in fünf Empfängertiere transferiert hatten. BERG (1983) beschrieb, daß fusionierte Zweizeller der Maus nach Transfer in Empfängertiere implantierten, sich aber maximal 50 % der implantierten Embryonen bis zum Tag 11 weiterentwickelten. SNOW (1975) stellte fest, daß nach Transfer von tetraploiden Blastozysten, die er durch Behandlung von Zweizellembryonen mit Cytochalasin B und deren anschließende Kultivierung erhalten hatte, maximal 31,8 % implantierten. Die implantierten tetraploiden Embryonen zeigten bis zum Tag 13 nach Transfer normale Entwicklung, wiesen jedoch in späteren Stadien der Gravidität mehrfache Entwicklungsanomalien auf. SNOW (1975) berichtete jedoch auch von der Geburt dreier Tiere, deren Tetraploidie nachgewiesen wurde. Alle drei wurden innerhalb weniger Stunden nach der Geburt von den Muttertieren aufgefressen. Ob diese Tiere Anomalien aufwiesen, wurde nicht berichtet.

Nach in vivo Kultur von 14 fusionierten Zweizellern des Kaninchens hatten sich von neun wiedergefundenen Embryonen sieben zu Morulae und Blastozysten entwickelt. Aufgrund der geringen Embryonenanzahl standen für weitere, länger dauernde in vivo Kulturen keine fusionierten Zweizeller des Kaninchens zur Verfügung. OZIL und MODLINSKI (1986) berichteten jedoch, daß sich tetraploide Kaninchenzweizeller nach der Implantation bis zum Tag 20 der Gravidität normal entwickeln konnten, wenngleich das Auftreten von Anomalien bereits ab früheren Entwicklungsstadien möglich war.

5.1.3 Eukleation fusionierter Zweizellembryonen

In den Eukleationsversuchen an fusionierten Mäusezweizellern konnten insgesamt 41 % der Embryonen enukleiert werden. Da in der Literatur dieselben Versuche noch nicht beschrieben wurden und von ähnlichen Versuchen wie zum Beispiel der Eukleation von Zweizellembryonen keine Eukleationsraten genannt wurden, stehen keine Vergleichsergebnisse zur Verfügung.

Die Eukleationsrate war bei Verwendung von M 2 als Eukleationsmedium mit 43 % signifikant höher als bei Verwendung von Whitten-Medium, in dem 38 % der Embryonen enukleiert werden konnten. Umgekehrt war die Degenerationsrate der Embryonen bei Verwendung von Whitten-Medium signifikant größer als bei Verwendung von M 2. Dieser Sachverhalt kann mit dem Umschlagen des pH-Wertes von Whitten-Medium ins Basische erklärt werden, wenn keine ständige CO₂-Begasung vorhanden ist. Während des Eukleationsablaufes war der Tropfen mit Eukleationsmedium, in dem die Embryomanipulation vollzogen wurde, über eine Zeitspanne von mindestens 30 Minuten der Raumatmosphäre ausgesetzt. Die Diffusion an der Grenze Medium - Luft lief schnell ab, da das Eukleationsmedium nicht mit Paraffin überschichtet war.

Die in vitro Kultur fusionierter enukleierter Zweizellembryonen zeigte, daß die Teilungsrate fusionierter enukleierter Zweizeller gegenüber unbehandelten Zweizellembryonen und fusionierten Zweizellembryonen signifikant kleiner war. Weil die unbehandelten und fusionierten Zweizellembryonen nur zum Teil gleichzeitig mit den fusionierten enukleierten Zweizellern kultiviert wurden, sind als Ursache für die schlechteren Teilungsraten Fehler in der in vitro Kultur nicht völlig auszuschließen. Ein Hinweis auf Mängel in der in vitro Kultur kann auch die Teilungsrate der fusionierten und mit Cytochalasin D vorbehandelten Embryonen sein, die ausschließlich gleichzeitig mit den fusionierten enukleierten Zweizellern kultiviert worden waren, und die sich nicht signifikant von der Teilungsrate der fusionierten enukleierten Zweizeller unterschied. Fehler in der in vitro Kultur können zum einen durch fehlerhafte Medienherstellung, zum anderen durch die bereits beschriebene unzureichende Begasung zustande kommen.

Der Anteil an Morulae und Blastozysten, der durch die in vitro Kultur fusionierter enukleierter Zweizellembryonen erhalten wurde, war mit 3 % signifikant niedriger als der Anteil an Morulae und Blastozysten aus fusionierten und mit Cytochalasin D behandelten Embryonen, der 18 % betrug. Daraus kann gefolgert werden, daß die Eukleation die Entwicklungsfähigkeit der Embryonen zu Morulae oder Blastozysten erheblich reduziert hatte. Denkbare Gründe dafür könnten in der Manipulation selbst liegen, bei der die Organisation des Zytoplasmas gestört werden kann, sowie in der entstandenen veränderten Kern/Zytoplasma-Relation, die den Zellstoffwechsel beeinflußt.

Nach in vivo Kultur von 242 fusionierten enukleierten Zweizellembryonen in 18 Empfängertieren über 3 bis 19 Tage wurden 9 % der Embryonen wiedergefunden. 82 % der wiedergefundenen Embryonen (18/22) wurden am Tag 3 der in vivo Kultur durch Spülung von zwei Empfängertieren erhalten. 18 % (4/22) der wiedergefundenen Embryonen wurden am Tag 15, 17 und 19

erhalten: ein normal entwickelter Fetus wurde am Tag 15 der in vivo Kultur gefunden, dagegen waren ein am Tag 17 bzw. zwei am Tag 19 gefundene Embryonen degeneriert.

Da sich in der präimplantatorischen Kulturphase 8 von 18 Embryonen, in der postimplantatorischen Phase jedoch nur einer von 4 Embryonen normal entwickelt hatten, ist anzunehmen, daß die ohnehin reduzierte Entwicklungsfähigkeit der Embryonen in der postimplantatorischen Phase noch kleiner als in der präimplantatorischen Phase war.

8 Empfängertiere, denen insgesamt 120 fusionierte enukleierte Zweizeller und 31 Kontrollembrionen übertragen worden waren, warfen 20 Tiere aus den Eukleationsversuchen und 17 Kontrolltiere. Die Überlebensrate der Kontrollembrionen war mit 55 % signifikant größer als die Überlebensrate der fusionierten enukleierten Embryonen, die 17 % betrug. Da die Überlebensraten der fusionierten enukleierten Embryonen in Tieren mit oder ohne gleichzeitiger Übertragung von Kontrollembrionen gleich waren, kann daraus geschlossen werden, daß die Entwicklung der fusionierten enukleierten Zweizeller durch gleichzeitig im Uterus des Empfängertieres heranwachsende Kontrollembrionen weder gehemmt noch gefördert wird.

5.2 Mehrzellembryonen

5.2.1 Elektrofusion

Über die Elektrofusion von Blastomeren innerhalb derselben, aus vier und mehr Blastomeren bestehenden Embryonen wurde von BERG (1982) und KUBIAK und TARKOWSKI (1985) bei Mäusen und von OZIL und MODLINSKI (1986) bei Kaninchen berichtet. Die Berichte beschränkten sich jedoch nur auf die Aussagen, daß Fusionen dieser Art möglich sind. Nähere Angaben zu Fusionsparametern und der Entwicklungspotenz entstandener Embryonen wurden von den Autoren nicht gemacht.

In der vorliegenden Arbeit war bei der Fusion von Blastomeren innerhalb von Mehrzellembryonen die Fusionsrate von Mäuseembryonen mit 84 % signifikant größer als die von Kaninchenembryonen, die 72 % betrug. Die Raten an erhaltenen diploid-tetraploid-Mosaiken aus den insgesamt in die Versuche einbezogenen Embryonen beider Tierarten waren jedoch mit 68 % bzw. 69 % nicht signifikant verschieden. Demnach war die Rate an erhaltenen diploid-tetraploid-Mosaiken in bezug auf die fusionierten Embryonen beim Kaninchen größer als bei Mäusen. Der Grund dafür lag bei näherer Betrachtung der Fusionsergebnisse verschiedener Mehrzellstadien an der niedrigen Rate entstandener Mosaik bei der Fusion von Mäusevierzellembryonen. Nur 25 % der Vierzeller konnten zu diploid-tetraploid-Mosaiken fusioniert werden. Bei Vierzellern war im Gegensatz zu Embryonalstadien mit mehr als vier Blastomeren die Wahrscheinlichkeit geringer, daß die Blastomeren bei Auslösung der Fusionspulse mit ihrer Kontaktfläche senkrecht zu den elektrischen Feldlinien standen. Dadurch fusionierten weniger Blastomeren.

Bei eintretender Blastomerenfusion war bei Vierzellern zu beobachten, daß neben Dreizellern, die diploid-tetraploid-Mosaik darstellten, auch Ein- und Zweizeller entstanden waren. Trotz Fusion waren in diesen Fällen somit keine diplo-

id-tetraploid-Mosaik entstanden. Bei Embryonalstadien mit mehr als vier Blastomeren waren Fusionen dieser Art seltener anzutreffen.

Bei der Fusion von Mehrzellembryonen der Maus konnte in allen Fällen sicher entschieden werden, ob Blastomeren fusioniert waren oder nicht. Im Gegensatz dazu konnte dies bei Kaninchen bei 8 % der Achtzeller, 58 % der frühen Morulae und 12 % der kompaktierten Morulae nicht mit Sicherheit bestimmt werden. Der Grund dafür lag in dem optisch dichteren Zytoplasma der Kaninchenblastomeren, welches die Beurteilung des Fusionserfolges unter dem Mikroskop erschwerte.

Die Dauer des angelegten Wechselstromfeldes zeigte auf die Fusionsrate, die Rate an erhaltenen Mosaiken und die Degenerationsrate von Mäusemehrzellern keinen Einfluß. Dagegen sank bei Kaninchenembryonen die Fusionsrate signifikant von 95 % auf 62 %, wenn die Alignmentdauer 10 bis 20 Sekunden statt weniger als 10 Sekunden betrug. Gleichzeitig wurde die Ausbeute an diploid-tetraploid-Mosaiken von 95 % auf 60 % reduziert. Die Ursache für die Abnahme der Mosaikrate lag bei längeren Alignmentdauern an der zunehmenden Fusion von Blastomeren. Die Anzahl der Embryonen, die neben fusionierten Blastomeren auch nicht fusionierte Blastomeren enthielten, nahm ab. Darüberhinaus entstanden zunehmend Blastomeren, die mehr als zwei Zellkerne enthielten.

Bei Kaninchenembryonen, die längerer Alignmentdauer ausgesetzt waren, stieg die Anzahl der Embryonen, deren Fusionsergebnis unsicher war. Das Gegenteil war erwartet worden, da das Alignment durch Schaffung eines engeren Zellkontaktes die Fusionsraten steigern und die Embryonen mit fraglichem Fusionsergebnis verringern sollte. Eine Erklärung kann für diese Erscheinung nicht gegeben werden.

Bei Betrachtung der Anzahl verwendeter Fusionspulse zeigte sich, daß bei Mehrzellern von Mäusen mit 2 Pulsen maximale

Fusionsraten von 97 % erreicht werden können. Bei Verwendung von einem Fusionspuls fusionierten 72 % der Mehrzeller, von denen wiederum 67 % diploid-tetraploid-Mosaik waren. Neben den Mosaiken waren auch Embryonen entstanden, von denen mehr als zwei Blastomeren miteinander fusioniert waren. Dies stand im Gegensatz zu den von KUBIAK und TARKOWSKI (1985) beschriebenen Fusionsversuchen an mehrzelligen Mäuseembryonen, bei denen für die Fusion von mehr als zwei Blastomeren eines Embryos mehr als ein Fusionspuls erforderlich gewesen war.

Die Steigerung der Anzahl der Fusionspulse erhöhte signifikant die Fusionsrate von Kaninchenembryonen. Gleichzeitig wurde die Rate an Embryonen mit unsicherem Fusionsergebnis gesenkt.

Unter Berücksichtigung der Pulsdauer war bei Mäuse- und Kaninchenembryonen ersichtlich, daß der Anteil von diploid-tetraploid-Mosaiken an fusionierten Embryonen mit zunehmender Pulsdauer abnahm. Dies kam dadurch zustande, daß um so mehr der Blastomeren fusionierten, je länger die Pulsdauer war. Dadurch stieg die Anzahl der Embryonen, bei denen mehr als zwei Blastomeren fusioniert waren und sank der Anteil der Embryonen, die neben fusionierten auch nicht fusionierte Blastomeren aufwiesen.

Die Steigerung der Pulsstärke führte bei Mäuseembryonen zu abnehmenden Fusionsraten, beim Kaninchen dagegen zur Steigerung der Fusionsraten. Gleichläufig nahm bei Mäusen die Rate der diploid-tetraploid-Mosaik ab, die der Kaninchen dagegen zu. Darüber hinaus war auffällig, daß bei Mäuseembryonen die Degenerationsraten mit steigender Pulsstärke signifikant größer wurden, bei Kaninchenembryonen dagegen von steigenden Pulsstärken unbeeinflusst blieben. Bei Mäusen schien demnach die kritische Feldstärke für den Membrandurchbruch so weit übertroffen worden zu sein, daß bei einem Teil der Embryonen die Membranveränderungen irreversibel geworden waren und als Folge daraus die Embryonen degenerierten. Bei Kaninchenembryo-

onen dagegen war die Durchbruchspannung zwar ebenfalls erreicht worden, was durch die Fusion von Blastomeren bewiesen war, aber selbst Steigerungen bis zu 0,89 kV/cm führten zu keinem Ansteigen der Degenerationsraten. Die Membranveränderungen waren demnach reversibel. Die obere Grenze der Pulsstärke, bei der die Membranveränderungen irreversibel wurden, war bei Kaninchen nicht erreicht worden.

5.2.2 Kultur fusionierter Mehrzellembryonen

Bei Mäusen konnten nach in vivo Kultur von 285 durch Elektrofusion erstellten diploid-tetraploid-Mosaiken in 17 Empfängertieren nach einer Kulturdauer zwischen 10 und 20 Tagen nur 4 Embryonen wiedergefunden werden. Nach zwei Transfers jedoch, bei denen neben 19 Mosaikembryonen auch 23 Kontroll-embryonen übertragen worden waren, warfen beide Empfängertiere Jungtiere aus diploid-tetraploid-Mosaiken und Kontrolltiere. Die gleichzeitige Entwicklung von Kontrollembryonen und Mosaikembryonen innerhalb desselben Empfängertieres schien demnach die Entwicklung von diploid-tetraploid-Mosaiken zu fördern.

Die in vivo Kultur in einem Kaninchen, bei der sich 30 % der diploid-tetraploid-Mosaiken innerhalb von 4 Tagen zu Blastozysten entwickelt hatten, war mit den in vivo Kulturen bei Mäusen aufgrund der kürzeren Kulturdauer nicht vergleichbar.

Nach dem Transfer von diploid-tetraploid-Mosaiken, Mehrzellern mit unsicherem Fusionsergebnis und Kontrollembryonen zeigte sich, daß die Überlebensrate der Embryonen mit unsicherem Fusionserfolg größer war als die Überlebensrate der Kontrollembryonen. Der Grund dafür kann in der unterschiedlich großen Anzahl übertragener Embryonen liegen, da gegenüber 67 Embryonen mit unsicherem Fusionsergebnis nur 14 Kontrollembryonen transferiert worden waren. Die Überlebensrate der Tiere aus dem Transfer von diploid-tetraploid-Mosaiken

war gegenüber den Überlebensraten von Kontrolltieren und Tieren aus Transfer von nicht sicher fusionierten Mehrzellembryonen deutlich reduziert. Gegenüber den Versuchen bei Mäusen war jedoch festzustellen, daß auch Tiere zur Geburt kamen, denen ausschließlich Mosaikembryonen übertragen worden waren. Die Totgeburtenraten mit 15 % und 20 % bei Tieren aus Mosaiktransfer und Tieren aus Transfer von nicht sicher fusionierten Mehrzellembryonen lagen im normalen Bereich von Kaninchengeburten.

5.2.3 DNA-Messung

Bei der Messung des DNA-Gehaltes verschiedener Körperzellen von Tieren, die aus dem Transfer von diploid-tetraploid-Mosaiken stammten, sollte festgestellt werden, ob durch die Fusion erstellte tetraploide Zellen im Verband mit diploiden Zellen bis zur Entwicklung adulter Tiere im Körper persistieren. Dabei wurde von der Cytofluorometrie Gebrauch gemacht, weil die Fluoreszenz der mit Propidiumiodid gefärbten DNA mit der Erhöhung des DNA-Gehaltes linear zunimmt und die Messung des DNA-Gehaltes vieler, einzelner Zellen möglich ist.

In Erwartung tetraploider Zellen war davon ausgegangen worden, daß sich in Proben eines diploid-tetraploid-Mosaiktieres zwei Fluoreszenzpeaks zeigen müßten: ein Peak, der die diploiden Zellen darstellt und mit dem Peak von Kontrolltierproben übereinstimmt und ein zweiter Peak, der im Bereich der doppelten Fluoreszenz des ersten Peaks liegen muß und tetraploide Zellen darstellt.

In Knochenmarksproben zweier Tiere aus dem Transfer von nicht sicher fusionierten Mehrzellern und eines Tieres aus Transfer von diploid-tetraploid-Mosaiken sowie in einer Hodenprobe eines Tieres aus Transfer von diploid-tetraploid-Mosaiken wurden je zwei Fluoreszenzpeaks gefunden. Daß der zweite Peak mit doppelt starker Fluoreszenz durch ein Zellaggregat aus

zwei Zellen verursacht worden war, konnte dadurch ausgeschlossen werden, daß die Suspension einzelner Zellen mikroskopisch überprüft wurde. Zusätzlich wurde bei der Probenmessung nur die Zellgruppe herangezogen, die die Mehrheit der Zellen darstellte, die gleiche Lichtstreuung zeigten. Meßverfälschungen durch Wechselwirkungen zwischen Propidiumiodid und der RNA konnten durch den Zusatz von RNase vor Meßbeginn ausgeschlossen werden.

Die Rechtsverschiebungen der Fluoreszenz-Peaks in 16 % der Proben von Tieren aus dem Transfer von Embryonen mit unsicherem Fusionserfolg und in 25 % der Proben von Tieren aus dem Transfer von diploid-tetraploid-Mosaiken waren in Bereichen zwischen dem Peak zu finden, der die diploiden Zellen der Kontrolltiere darstellte und dem Peak, der tetraploide Zellen darstellen würde. Der DNA-Gehalt der Zellen lag demnach zwischen dem von diploiden und dem von tetraploiden Zellen. Ursache dafür könnte das instabile Genom der tetraploiden Zellen sein, das sich mit den Zellteilungen verringert hat.

5.3 Ausblick

In den Versuchen konnten Fusionsparameter ermittelt werden, bei deren Verwendung bis zu 95 % der Mäusezweizeller, 56 % der Kaninchenzweizeller und 75 % der Schweinezweizeller zu tetraploiden Embryonen fusionierten. Die Elektrofusion bietet sich zur Erstellung tetraploider Embryonen an, da sie anderen Methoden durch einfachere Handhabung und hohe Ausbeuten an tetraploiden Embryonen überlegen ist. Die tetraploiden Embryonen teilen sich nach der Fusion in vitro weiter. Dies ermöglicht die Erforschung der Entwicklungsfähigkeit tetraploider Embryonen in der präimplantatorischen Phase. Durch weitere in vivo Kulturen muß nun abgeklärt werden, zu welchem Zeitpunkt die durch Elektrofusion erstellten tetraploiden Embryonen absterben. Von Interesse wird sein, die Ursachen für den frühzeitigen Tod zu finden. Insbesondere sollten dabei Gen-Dosis-Effekte berücksichtigt werden.

Durch Elektrofusion von Blastomeren innerhalb von Mehrzellembryonen konnten Fusionsparameter ermittelt werden, mit denen diploid-tetraploid-Mosaik erstellt werden können. Die Mosaik überleben bis über die Geburt hinaus. Tetraploide Zellen wurden in adulten Kaninchen nachgewiesen, die diesen Versuchen entstammten. Somit stellt die Elektrofusion eine Möglichkeit dar, diploid-tetraploid-Mosaik mit Hilfe einer einfachen Fusionstechnik zu erstellen. In weiteren Versuchen müssen Fusionsparameter gefunden werden, die hohe Ausbeuten an lebenden diploid-tetraploid-Mosaiken mit sich bringen, sowie den Anteil an tetraploiden Zellen im Tierkörper erhöhen. Die Anwesenheit tetraploider Zellen im Körper geborener Tiere ermöglicht Einblicke in die Wechselwirkungen zwischen diploiden und tetraploiden Zellen. Darüberhinaus kann untersucht werden, warum das Genom tetraploider Zellen instabil ist, wie sich in den Versuchen bei einigen Tieren gezeigt hatte.

Die E nukleationsversuche zeigten, daß fusionierte enukleierte Zweizellembryonen der Maus, wenn auch mit geringerer Überlebensrate, entwicklungsfähig sind. Dadurch steht es nun offen, Zwillingsembryonen durch Fusion, E nukleation und anschließenden Kerntransfer mit Hilfe der Elektrofusion zu erstellen. Die E nukleationstechnik sollte in weiteren Versuchen auf Nutztierembryonen übertragen und in der Weise ausgebaut werden, daß fusionierte enukleierte sowie Kernempfängerembryonen kultiviert werden und nach ihrer erneuten Teilung zu Zweizellern wieder zur Fusion, E nukleation und zum Kerntransfer herangezogen werden können.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war es, Fusionsparameter für die Elektrofusion zu ermitteln, mit denen tetraploide Mäuse-, Kaninchen- und Schweineembryonen durch die Fusion von Zweizellembryonen innerhalb der Zona pellucida erstellt werden können.

Maximale Fusionsraten von 95 % wurden bei Mäusezweizellern erzielt, wenn ein Fusionspuls mit der Pulsdauer von 70 μ s und der Pulsstärke von 0,60-0,89 kV/cm verwendet wurde.

Die höchste Fusionsrate mit 56 % wurde bei Kaninchenzweizellembryonen durch sieben Fusionspulse mit der Pulsdauer von 50 μ s und der Pulsstärke von 0,50-0,79 kV/cm erzielt.

Bei Berücksichtigung von Pulsanzahl, Pulsdauer und Pulsstärke wurden bei Schweinezweizellern maximale Fusionsraten von 73 % durch zwei Pulse mit der Dauer von 70 μ s und der Stärke von 0,70-0,79 kV/cm erzielt.

In vitro teilten sich die tetraploiden Embryonen von Mäusen bis zum Blastozysten-, von Kaninchen bis zum Morula- und von Schweinen bis zum Vierzellstadium weiter.

In in vivo Kulturen bei der Maus und beim Kaninchen konnte die Entwicklung der tetraploiden Embryonen bis zum Blastozystenstadium verfolgt werden. Aus den Transfers von tetraploiden Embryonen bei der Maus wurden keine Tiere geboren.

Weiterhin sollten in dieser Arbeit Fusionsparameter für die Elektrofusion ermittelt werden, mit denen es möglich ist, durch die Fusion von Blastomeren innerhalb von Mehrzellembryonen der Maus und des Kaninchens diploid-tetraploid-Mosaike zu erstellen.

Bei Mäusemehrzellern war die Rate an diploid-tetraploid-Mosaiken am größten, wenn zwei Fusionspulse, Pulsdauern von 60 μ s und Pulsstärken von 0,50-0,59 kV/cm verwendet wurden.

Die Rate an diploid-tetraploid-Mosaiken war bei Kaninchenmehrzellern mit fünf Fusionspulsen, Pulsdauern von 60 μ s und Pulsstärken von 0,70-0,89 kV/cm am größten.

Tiere aus transferierten diploid-tetraploid-Mosaiken wurden von Mäusen und Kaninchen geboren. Die Messung des DNA-Gehaltes von geborenen Kaninchen zeigte bei drei Tieren die Anwesenheit von diploiden und tetraploiden Zellen im Knochenmark und bei einem Tier im Hodengewebe auf. Außerdem konnten erhöhte DNA-Gehalte in verschiedenen Organen der Tiere festgestellt werden, die im Bereich zwischen den DNA-Gehalten von diploiden und tetraploiden Zellen lagen.

Durch Eukleation von fusionierten Mäusezweizellern sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob fusionierte und enukleierte Zweizellembryonen überlebensfähig sind.

43 % der fusionierten Mäusezweizeller konnten erfolgreich enukleiert werden, wenn M 2 als Eukleationsmedium verwendet wurde. 30 % der Embryonen teilten sich anschließend in der in vitro Kultur weiter, wobei 3 % der Embryonen das Morula- und Blastozystenstadium erreichten. In graviden Empfängertieren überlebten 17 % der fusionierten enukleierten Zweizeller bis zur Geburt.

7. SUMMARY

Electrofusion and enucleation of blastomeres in mammalian embryos.

The objective of this study was to find parameters for the electrofusion which allow the production of tetraploid mouse, rabbit and pig embryos by fusion of two-cell embryos within the zona pellucida.

For mouse two-cell embryos maximum fusion rates of 95 % were achieved by using one fusion pulse with a pulse duration of 70 μ s and a field strength of 0,60-0,89 kV/cm.

The highest fusion rate for rabbit two-cell embryos (56 %) was reached with seven fusion pulses with a duration of 50 μ s and a field strength of 0,50-0,89 kV/cm each.

For pig two-cell embryos maximum fusion rates of 73 % were achieved by using two pulses with a duration of 70 μ s and a field strength of 0,70-0,79 kV/cm each.

In vitro the tetraploid embryos of mice developed to blastocysts, those of rabbits to morulae and those of pigs to four-cell stages.

In vivo cultures of mice and rabbits showed the development of tetraploid embryos to blastocysts. No animals were born from the transfer of tetraploid mouse embryos.

A further objective of the study was to find suitable electrofusion parameters for the production of diploid-tetraploid mosaics by fusion of blastomeres within 4- and 8-cell embryos or morulae of mice and rabbits.

For 4- and 8-cell embryos or morulae of mice the highest rate of diploid-tetraploid mosaics was reached with two fu-

sion pulses, pulse durations of 60 μ s and field strengths of 0,50-0,59 kV/cm.

For 4- and 8-cell embryos or morulae of rabbits five fusion pulses, pulse durations of 60 μ s and pulse strengths of 0,70-0,89 kV/cm brought the highest rate of diploid-tetraploid mosaics.

Mice and rabbits were born from transferred diploid-tetraploid mosaics. The DNA content of born rabbits was measured and showed the presence of diploid and tetraploid cells in the bone marrow of three animals and in the testicle tissue of one animal. Furthermore increased DNA contents - in the range between the DNA contents of diploid and tetraploid cells - were found in several organs of the animals.

By enucleation of fused mouse two-cell embryos it was investigated if fused and enucleated two-cell embryos are able to survive.

43 % of the fused two-cell embryos of mice were enucleated successfully, when M 2 was used as enucleation medium. Subsequently 30 % of the embryos continued their development in in vitro culture with 3 % reaching the morula and blastocyst stages. In pregnant foster mothers 17 % of the fused and enucleated two-cell embryos survived until birth.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- AHKONG, Q.F., D. FISHER, W. TAMPION, J.A. LUCY, 1975
Mechanisms of cell fusion
Nature 253, 194-195
- ATNIP, R.L., R.L. SUMMITT, 1971
Tetraploidy and 18-trisomy in a six-year-old triple mosaic boy
Cytogenetics 10, 305-317
- BÄCHI, T., C. HOWE, 1972
Fusion of erythrocytes by Sendai virus studied by electron microscopy
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 141, 141-149
- BÄCHI, T., M. AGUET, C. HOWE, 1973
Fusion of erythrocytes by Sendai virus studied by immuno-freeze-etching
J. Virol. 11, 1004-1012
- BARANSKA, W., H. KOPROWSKI, 1970
Fusion of unfertilized mouse eggs with somatic cells
J. exp. Zool. 174, 1-14
- BARNES, F.L., R.S. PRATHER, J.M. ROBL, N.L. FIRST, 1987
Multiplication of bovine embryos
Theriogenology 27, 209
- BATES, G.W., 1985
Electrical fusion for optimal formation of protoplast heterokaryons in Nicotina
Planta 165, 217-224

BAUERNFEIND, M., B. BRINKMANN, M. LEIPOLDT, 1986

Entwicklungspotenz polyploider Zellen während der Ontogenese am Beispiel der 2n/4n Chimäre bei der Maus
Zuchthygiene 21, 150

BAUERNFEIND, M., M. LEIPOLDT, 1987

Fertilität von diploid/tetraploid Chimären der Maus
Fertilität 3, 200-202

BENZ, R., F. BECKERS, U. ZIMMERMANN, 1979

Reversible electrical breakdown of lipid bilayer membranes: A charge-pulse relaxation study
J. Membrane Biol. 48, 181-204

BENZ, R., U. ZIMMERMANN, 1981

The resealing process of lipid bilayers after reversible electrical breakdown
Biochim. Biophys. Acta 640, 169-178

BERG, D., I. SCHUMANN, A. STELZNER, 1983

Electrically stimulated fusion between myeloma cells and spleen cells
Stud. Biophys. 94, 101-102

BERG, H., 1982

Biological implications of electric field effects:
V: Fusion of blastomeres and blastocysts of mouse embryos
Bioelectrochem. Bioenerg. 9, 223-228

BERG, H., A. KURISCHKO, R. FREUND, 1983

Biological implications of electric field effects
VI: Fusion of mouse blastomeres without and within zona pellucida
Studia biophysica 94, 103-104

BERG, H., K. AUGSTEN, E. BAUER, W. FÖRSTER, H.-E. JACOB, P. MÜHLING, H. WEBER, 1984

Possibilities of cell fusion and transformation by electrostimulation

Bioelectrochem. Bioenerg. 12, 119-133

BISCHOFF, R., R.M. EISERT, I. SCHEDEL, J. VIENKEN, U. ZIMMERMANN, 1982

Human hybridoma cells produced by electro-fusion

FEBS Lett. 147, 64-68

BREM, G., 1986

Mikromanipulation an Rinderembryonen und deren Anwendungsmöglichkeiten in der Tierzucht

Stuttgart: Enke

BRIGGS, R., T.J. KING, 1952

Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frog eggs

Zoology 38, 455-463

BROCKMANN, G., 1985

Methodische Untersuchungen zur Zellkernübertragung zwischen embryonalen Zellen der Maus

Dummerstorf: Diss. rer. nat.

BROMHALL, J.D., 1975

Nuclear transplantation in the rabbit embryo

Nature 258, 719-722

BUSCHL, R., H. RINGSDORF, U. ZIMMERMANN, 1982

Electric field-induced fusion of large liposomes from natural and polymerizable lipids

FEBS Letters 150, 38-42

CLEMENT, A., J. MEYER, G. BREM, 1988

Electrofusion of early mammalian embryo cells

In: New Developments in Biosciences: Their Implications for Laboratory Animal Science, ed. BEYNEN, A.C., H.A. SOL-LEVELD

Martinus Nijhoff Publishers, 343-347

CLEMENT-SENCEWALD, A., G. BREM, 1988

Attempts for production of diploid-tetraploid mosaics by electrofusion of blastomeres in rabbits

In: Proc. of the 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Dublin, Ireland, 1988, 470

CRANE, J.S., H.A. POHL, 1968

A study of living and dead yeast cells using dielectrophoresis

J. Electrochem. Soc. 115, 584-586

CROCE, C.M., H. KOPROWSKI, H. EAGLE, 1972

Effect of environmental pH on the efficiency of cellular hybridization

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 1953-1956

DANIELLI, J.F., I.J. LORCH, M.J. ORD, E.G. WILSON, 1955

Nucleus and cytoplasm in cellular inheritance

Nature 176, 1114-1115

DAVIDSON, R.L., K.A. O'MALLEY, T.B. WHEELER, 1976

Polyethylene glycol-induced mammalian cell hybridization: effect of polyethylene glycol molecular weight and concentration

Som. Cell G. 2, 271-280

DIMITROV, D.S., 1984

Electric field-induced breakdown of lipid bilayers and cell membranes: a thin viscoelastic film model

J. Membrane Biol. 78, 53-60

EGLITIS, M.A., 1980

Formation of tetraploid mouse blastocysts following blastomere fusion with polyethylene-glycol

J. exp. Zool. 213, 309-313

EPEL, D., V.D. VACQUIER, 1978

Membrane fusion events during intervertebrate fertilization

In: Cell Surface Reviews Vol.5: Membrane Fusion

Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1-63

FÖRSTER, E., C.C. EMEIS, 1985

Quantitative studies on the viability of yeast protoplasts following dielectrophoresis

FEMS Microbiol. Lett. 26, 65-69

FROMM, M., L.P. TAYLOR, V. WALBOT, 1985

Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 5824-5828

FULKA jr., J., J. MOTLIK, J. FULKA, N. CROZET, 1985

Inhibition of nuclear maturation in fully grown porcine and mouse oocytes after their fusion with growing porcine oocytes

J. exp. Zool. 235, 255-259

GILES, R.E., F.H. RUDDLE, 1973

Production of Sendai virus for cell fusion

In Vitro 9, 103-107

GULYAS, B.J., M. WOOD, D.G. WITTINGHAM, 1984

Fusion of oocytes and development of oocyte fusion products in the mouse

Develop. Biol. 101, 246-250

GURDON, J.B., 1977

Egg cytoplasm and gene control in development

Proc. R. Soc. Lond. B. 198, 211-247

GURDON, J.B., R.A. LASKEY, O.R. REEVES, 1975

The developmental capacity of nuclei transplanted from keratinized skin cells of adult frogs

J. Embryol. exp. Morph. 34, 93-112

HALFMANN, H.J., W. RÖCKEN, C.C. EMEIS, U. ZIMMERMANN, 1982

Transfer of mitochondrial function into a cytoplasmic respiratory-deficient mutant of *Saccharomyces* yeast by electro-fusion

Current Genetics 6, 25-28

HALFMANN, H.J., C.C. EMEIS, U. ZIMMERMANN, 1983

Electro-fusion and genetic analysis of fusion products of haploid and polyploid *Saccharomyces* yeast cells

FEMS Lett. 20, 13-16

HARPER, M.J.K., M.C. CHANG, 1971

Some aspects of the biology of mammalian eggs and spermatozoa

Adv. reprod. Physiol. 5, 167-218

HARRIS, H., J.F. WATKINS, 1965

Hybrid cells derived from mouse and man: artificial heterokaryons of mammalian cells from different species

Nature 205, 640-646

- HASHIMOTO, H., H. MORIKAWA, Y. YAMADA, A. KIMURA, 1985
 A novel method for transformation of intact yeast cells by
 electroinjection of plasmid DNA
 Appl. Microbiol. Biotechnol. 21, 336-339
- HAYDON, D.A., J. TAYLOR, 1964
 The stability and properties of bimolecular lipid leaflets
 in aqueous solutions
 J. Theoret. Biol. 4, 281-296
- HOPPE, P.C., K. ILLMENSEE, 1977
 Microsurgically produced homozygous-diploid uniparental
 mice
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 12, 5657-5661
- HOPPE, P.C., K. ILLMENSEE, 1982
 Full-term development after transplantation of partheno-
 genetic embryonic nuclei into fertilized mouse eggs
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 1912-1916
- HOWELL, J.I., J.A. LUCY, 1969
 Cell fusion induced by Lysolecithin
 FEBS Letters 4, 147-150
- HUI, S.W., T.P. STEWART, L.T. BONI, 1981
 Membrane fusion through point defects in bilayers
 Science 212, 921-922
- ILLMENSEE, K., 1987
 Persönliche Mitteilung
 Genf, 06. 04. 1987
- ILLMENSEE, K., P.C. HOPPE, 1981
 Nuclear transplantation in *Mus musculus*:
 Developmental potential of nuclei from preimplantation em-
 bryos
 Cell 23, 9-18

JACOB, H.-E., F. SIEGEMUND, E. BAUER, 1984

Fusion von pflanzlichen Protoplasten durch elektrischen
Feldimpuls nach Dielectrophorese
Biol. Zbl. 103, '77-82

KAO, K.N., M.R. MICHAYLUK, 1974

A method for high-frequency intergeneric fusion of plant
protoplasts
Planta 115, 355-367

KELLER, W.A., G. MELCHERS, 1973

The effect of high pH and calcium on tobacco leaf proto-
plast fusion
Z. Naturforsch. 28c, 737-741

KELLY, T.E., J.M. RARY, 1974

Mosaic tetraploidy in a two-year-old female
Clin. Genet. 6, 221-224

KLEBE, R.J., M.G. MANUSCO, 1981

Chemicals which promote cell hybridization
Somatic Cell Genetics 7, 473-488

KNUTTON, S., 1980

Studies of membrane fusion
VI: Mechanism of the membrane fusion and cell swelling
stages of Sendai virus-mediated cell fusion
J. Cell Sci. 43, 103-118

KÖHLER, G., C. MILSTEIN, 1975

Continuous cultures of fused cells secreting antibody of
predefined specificity
Nature 256, 495-497

- KOHN, G., B.H. MAYHALL, M.E. MILLER, W.J. MELLMANN, 1967
Tetraploid-diploid mosaicism in a surviving infant
Pediat. Res. 1, 461-469
- KOHN, H., R. SCHIEDER, O. SCHIEDER, 1985
Somatic hybrids in Tobacco mediated by electrofusion
Plant Science 38, 121-128
- KOOP, H.U., 1984
Mitteilung Botanikertagung Wien, 72
zit. nach ZIMMERMANN (1986)
- KOOP, H.U., J. DIRK, D. WOLFF, H.G. SCHWEIGER, 1983
Somatic hybridization of two selected single cells
Cell Biol. Int. Rep. 7, 1123-1126
- KOPROWSKI, H., C.M. CROCE, 1973
Fusion of somatic and gametic cells with Lysolecithin
Methods Cell Biol. 7, 251-260
- KUBIAK, J.Z., A.K. TARKOWSKI, 1985
Electrofusion of mouse blastomeres
Exp. Cell Res. 157, 561-566
- LANGRIDGE, W.H.R., B.J. LI, A.A. SZALAY, 1985
Electric field mediated stable transformation of carrot
protoplasts with naked DNA
Plant Cell Reports 4, 355-359
- LIN, T.P., 1971
Egg micromanipulation
In: Methods in Mammalian Embryology, ed. W.H. FREEMAN
San Francisco: J.C. Daniel, 157-171

LIN, T.P., J. FLORENCE, O.J. OH, 1973

Cell fusion induced by virus within the zona pellucida of mouse eggs

Nature 242, 47-79

LO, M.M.S., T.Y. TSONG, M.K. CONRAD, S.M. STRITTMATTER, L.D. HESTER, S.H. SNYDER, 1984

Monoclonal antibody production by receptor-mediated electrically induced cell fusion

Nature 310, 297-294

LORCH, I.J., J.F. DANIELLI, 1953

Nuclear transplantation in Amoebae

The immediate results of transfer of nuclei between Amoeba proteus and Amoeba discoides

Quart. J. Microsc. Sci. 94, 461-480

LU, T.-Y., C.L. MARKERT, 1980

Manufacture of diploid/tetraploid chimeric mice

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 6012-6016

LUCHTEL, D., J.G. BLUMENIK, S.W. DE LAAT, 1976

The effect of injected Cytochalasin B on filament organization in the cleaving egg of *Xenopus laevis*

J. Ultrastruct. Res. 54, 406-419

LUCY, J.A., 1970

The fusion of biological membranes

Nature 227, 815-817

MANN, J.R., R.H. LOVELL-BADGE, 1984

Inviability of parthenogenones is determined by pronuclei, not egg cytoplasm

Nature 310, 66-67

MARAZ, A., M. KISS, L. FERENCZY, 1978

Protoplast fusion in *Saccharomyces cerevisiae* strains of identical and opposite mating types
FEMS Microbiol. Lett. 3, 319-322

MARKERT, C.L., R.M. PETERS, 1977

Homozygous mouse embryos produced by microsurgery
J. exp. Zool. 201, 295-302

MARX, J.L., 1981

Three mice cloned in Switzerland
Science 211, 375-376

MARX, J.L., 1988

Cloning sheep and cattle embryos
Science 239, 463-464

McGRATH, J., D. SOLTER, 1983a

Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion
Science 220, 1300-1302

McGRATH, J., D. SOLTER, 1983b

Nuclear transplantation in mouse embryos
J. exp. Zool. 228, 355-362

McGRATH, J., D. SOLTER, 1984

Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development in vitro
Science 226, 1317-1319

McLAREN, A., 1984

Methods and success of nuclear transplantation in mammals
Nature 301, 671-672

MELIKYAN, G.B., I.G. ABIDOR, L.V. CHERNOMORDIK, L.M. CHAILAKHYAN, 1983

Electrostimulated fusion and fission of bilayer lipid membranes

Biochim. Biophys. Acta 730, 395-398

MODLINSKI, J.A., 1978

Transfer of embryonic nuclei to fertilized mouse eggs and development of tetraploid blastocysts

Nature 273, 466-467

MODLINSKI, J.A., 1981

The fate of inner cell mass and trophectoderm nuclei transplanted to fertilized mouse eggs

Nature 292, 342-343

MUTH, E., 1927

Über die Erscheinung der Perlschnurkettenbildung von Emulsionspartikelchen unter Einwirkung eines Wechselfeldes
Kolloid-Zeitschrift 41, 97-102

NAGATA, T., 1978

A novel cell-fusion method of protoplasts by polyvinylalcohol

Naturwiss. 65, 263-264

NEUMANN, E., K. ROSENHECK, 1972

Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes

J. Membrane Biol. 10, 279-290

NEUMANN, E., G. GERISCH, K. OPATZ, 1980

Cell fusion induced by high electric impulses applied to Dictyostelium

Naturwissenschaften 67, 414-415

NEUMANN, E., M. SCHAEFER-RIDDER, Y. WANG, P.H. HOFSCHEIDER,
1982

Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in
high electric fields

EMBO Journal 1, 841-845

OHNO-SHOSAKU, T., Y. OKADA, 1984

Facilitation of electrofusion of mouse lymphoma cells by
the proteolytic action of proteases

Biochem. Biophys. Res. Comm. 120, 138-143

OKADA, Y., 1962

Analysis of giant polynuclear cell formation caused by HVJ
virus from Ehrlich's ascites tumor cells

I. Microscopic observation of giant polynuclear cell for-
mation

Exp. Cell Res. 26, 98-107

OKADA, Y., 1985

Cell fusion and cell engineering

BIKEN J. 28, 37-38

OKADA, Y., T. SUZUKI, Y. HOSAKA, 1957

Interaction between influenza virus and Ehrlich's tumor
cells

III: Fusion phenomenon of Ehrlich's tumor cells by the ac-
tion of HVJ Z strain

Med. J. Osaka Univ. 7, 709-717

OZIL, J.-P., J.A. MODLINSKI, 1986

Effects of electric fields on fusion rate and survival of
2-cell rabbit embryos

J. Embryol. exp. Morph. 96, 211-228

PAPADIMITRIOU, J., 1978

Macrophage fusion in vivo and in vitro: a review

In: Cell Surface Reviews Vol.5: Membrane Fusion

Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 181-218

PAPAHADJOPOULOS, D., 1978

Calcium-induced phase changes and fusion in natural and model membranes

In: Cell Surface Reviews Vol.5: Membrane Fusion

Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 765-790

PAPAHADJOPOULOS, D., G. POSTE, B.E. SCHAEFFER, W.J. VAIL, 1974

Membrane fusion and molecular segregation in phospholipid vesicles

Biochim. Biophys. Acta 352, 10-28

PILWAT, G., H.-P. RICHTER, U. ZIMMERMANN, 1981

Giant culture cells by electric field-induced fusion

FEBS Letters 133, 169-174

POHL, H. A., 1978

Dielectrophoresis

Cambridge: Cambridge University Press

PORTER, K.R., 1939

Androgenetic development of the egg of *Rana pipiens*

Biol. Bull. 77, 233-257

PONTECORVO, G., 1975

Production of mammalian somatic cell hybrids by means of PEG-treatment

Somatic Cell Genetics 1, 397-400

- POOLE, A.R., J.I. HOWELL, J.A. LUCY, 1970
Lysolecithin and cell fusion
Nature 227, 810-814
- POSTE, G., 1972
Mechanisms of virus-induced cell fusion
Int. Rev. Cytol. 33, 157-237
- POSTE, G., A.C. ALLISON, 1973
Membrane fusion
Biochim. Biophys. Acta 300, 421-465
- POSTE, G., C.A. PASTERNAK, 1978
Virus-induced cell fusion
In: Cell Surface Reviews Vol.5: Membrane Fusion
Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 305-367
- PRATHER, R.S., M.L. SIMS, N.L. FIRST, 1988
Nuclear transplantation in the early porcine embryo
Theriogenology 29, 290
- RAO, P.N., R.T. JOHNSON, 1972
Cell fusion and its application to studies on the regulation of the cell cycle
Methods Cell Physiol. 5, 75-126
- RICHTER, H.-P., P. SCHEURICH, U. ZIMMERMANN, 1981
Electric field-induced fusion of sea urchin eggs
Develop. Gr. 23, 479-486
- ROBL, J.M., N.L. FIRST, 1985
Transfer of nuclei from eight-cell to two-cell murine embryos
Theriogenology 23, 222

- ROBL, J.M., B. GILLIGAN, E.S. CRISTER, N.L. FIRST, 1986a
Nuclear transplantation in mouse embryos
Biol. Reprod. 34, 733-739
- ROBL, J.M., R. PRATHER, W. EYESTONE, F. BARNES, D. NORTHEY,
B. GILLIGAN, N.L. FIRST, 1986b
Nuclear transplantation in bovine embryos
Theriogenology 25, 189
- ROBL, J.M., R. PRATHER, F. BARNES, W. EYESTONE, D. NORTHEY,
B. GILLIGAN, N.L. FIRST, 1987
Nuclear transplantation in bovine embryos
J. Anim. Sci. 64, 642-647
- RUTHE, H.-J., J. ADLER, 1985
Fusion of bacterial spheroplasts by electric fields
Biochim. Biophys. Acta 819, 105-113
- SALE, A.J.H., W.A. HAMILTON, 1967
Effects of high electric fields on microorganisms
I. Killing of bacteria and yeasts
Biochim. Biophys. Acta 148, 781-788
- SALHANI, N., H. SCHNABL, G. KÜPPERS, U. ZIMMERMANN, 1982
The hydraulic conductivity as a criterion for the membrane
integrity of protoplasts fused by an electrical field
pulse
Planta 155, 140-145
- SAWICKI, W., H. KOPROWSKI, 1971
Fusion of rabbit spermatozoa with somatic cells cultivated
in vitro
Exp. Cell Res. 66, 145-151

SCHAEFER-RIDDER, M., Y. WANG, P.H. HOFSCHEIDER, 1982

Liposomes as gene carriers: efficient transformation of mouse L cells by thymidine kinase gene
Science 215, 166-168

SCHNETTLER, R., U. ZIMMERMANN, 1985

Influence of the composition of the fusion medium on the yield of electrofused yeast hybrids
FEMS Lett. 27, 195-198

SENDA, M., J. TAKEDA, S. ABE, T. NAKAMURA, 1979

Induction of cell fusion of plant protoplasts by electric stimulation
Plant and Cell Physiol. 20, 1441-1443

SHIVAROVA, N., W. FÖRSTER, H.E. JACOB, R. GRIGOROVA, 1983

Microbiological implications of electric field effects
VII: Stimulation of plasmid transformation of *Bacillus cereus* protoplasts by electric field pulses
Z. Allg. Mikrobiologie 23, 595-599

SHIVAROVA, N., R. GRIGOROVA, W. FÖRSTER, H.-E. JACOB, H. BERG, 1983

Microbiological implications of electric field effects
Fusion of *Bacillus thuringiensis* protoplasts by high electric field pulses
Bioelectrochem. Bioenerg. 11, 181-185

SNOW, M.H.L., 1973

Tetraploid mouse embryos produced by Cytochalasin B during cleavage
Nature 244, 513-514

SNOW, M.H.L., 1975

Embryonic development of tetraploid mice during the second half of gestation
J. Embryol. exp. Morph. 34, 707-721

SOUPART, P., 1980

Initiation of mouse embryonic development by oocyte fusion
Arch. Androl. 5, 55-57

SOUPART, P., C.A. TORBIT, J.E. REPP, 1979

Blastocysts obtained by fusion of mouse oocytes
J. Biol. Reprod. Supp. 1, 50A

SPINDLE, A., 1981

Polyethylene glycol-induced fusion of two-cell mouse
embryo blastomeres
Expl. Cell Res. 131, 465-470

SPRINGMANN, K., G. BREM, 1988

Embryotransfer beim Schwein im Rahmen von Gen-
transferprogrammen
Tierärztliche Praxis
(im Druck)

STICE, S.L., H.M. BEAN, J.M. ROBL, 1987

Nuclear activation and transplantation in the rabbit
oocyte
In: 20th Anniversary Meeting of the Society for the Study
of Reproduction, Urbana, Illinois, USA, 20.-23. July,
1987, Biol. Reprod. Vol.36, Suppl. No.1, 77

STOPPER, H., U. ZIMMERMANN, E. WECKER, 1985

High yields of DNA-transfer into mouse L-cells by elec-
tropermeabilization
Z. Naturforsch. 40c, 929-923

SUKHAREV, S.I., L.V. CHERNODORDIK, I.G. ABIDOR, 1983

Reversible electrical breakdown of BLM
Pore development study
Studia biophysica 94, 73-74

SURANI, M.A.H., S.C. BARTON, 1983

Development of gynogenetic eggs in the mouse

Implications for parthenogenetic embryos

Science 222, 1034-1036

SURANI, M.A.H., S.C. BARTON, M.L. NORRIS, 1984

Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis

Nature 308, 548-550

SURANI, M.A.H., S.C. BARTON, M.L. NORRIS, 1986

Nuclear transplantation in the mouse:

Heritable differences between parental genomes after activation of the embryonic genome

Cell 45, 127-136

SZÖLLÖSI, D., H. BALAKIER, R. CZOŁOWSKA, A.K. TARKOWSKI, 1980

Ultrastructure of cell hybrids between mouse oocytes and blastomeres

J. exp. Zool. 213, 315-325

TARKOWSKI, A.K., A. WITKOWSKA, J. OPAS, 1977

Development of cytochalasin B-induced tetraploid and diploid/tetraploid mosaic mouse embryos

J. Embryol. exp. Morph. 41, 47-64

TEISSIE, J., V.P. KNUTSON, T.Y. TSONG, M.D. LANI, 1982

Electric pulse-induced fusion of 3T3 cells in monolayer culture

Science 216, 537-538

TEMPELAAR, M.J., M.G.K. JONES, 1985a

Fusion characteristics of plant protoplasts in electric fields

Planta 165, 205-216

TEMPELAAR, M.J., M.G.K. JONES, 1985b

Directed electrofusion between protoplasts with different responses in a mass fusion system
Plant Cell Rep. 4, 92-95

TSUNODA, Y., T. YASUI, K. NAKAMURA, T. UCHIDA, T. SUGIE, 1986

Effect of cutting the zona pellucida on the pronuclear transplantation in the mouse
J. exp. Zool. 240, 119-125

TSUNODA, Y., Y. KATO, Y. SHIODA, 1987

Electrofusion for the pronuclear transplantation of mouse eggs
Gamete Res. 17, 15-20

VIENKEN, J., U. ZIMMERMANN, 1982

Electric field-induced fusion: electro-hydraulic procedure for production of heterokaryon cells in high yields
FEBS Lett. 137, 11-13

VIENKEN, J., U. ZIMMERMANN, M. FOUCHARD, D. ZAGURY, 1983

Electrofusion of myeloma cells on the single cell level
Fusion under sterile conditions without proteolytic enzyme treatment
FEBS Lett. 163, 54-56

WALLIN, A., K. GLIMELIUS, T. ERIKSSON, 1974

The induction of aggregation and fusion of *Daucus carota* protoplasts by polyethylene glycol
Z. Pflanzenphysiol. 74, 64-80

WEBER, H., W. FÖRSTER, H.-E. JACOB, H. BERG, 1981a

Microbiological implications of electric field effects
III. Stimulation of yeast protoplast fusion by electric field pulses
Z. für Allg. Mikr. 21, 555-562

- WEBER, H., W. FÖRSTER, H. BERG, H.E. JACOB, 1981b
 Parasexual hybridization of yeasts by electric field stimulated fusion of protoplasts
 Curr. Genet. 4, 165-166
- WILLADSEN, S.M., 1986
 Nuclear transplantation in sheep embryos
 Nature 320, 63-65
- ZIMMERMANN, U., 1982
 Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena
 Biochim. Biophys. Acta 494, 227-277
- ZIMMERMANN, U., 1983
 Electrofusion of cells: principles and industrial potential
 Trends in Biotechnology 1, 149-155
- ZIMMERMANN, U., 1986
 Electrical breakdown, electropermeabilization and electrofusion
 Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 105, 175-256
- ZIMMERMANN, U., J. SCHULZ, G. PILWAT, 1973
 Transcellular ion flow in Escherichia coli and electrical sizing of bacterias
 Biophysical J. 13, 1005-1013
- ZIMMERMANN, U., G. PILWAT, F. RIEMANN, 1974a
 Dielectric breakdown of cell membranes
 Biophys. J. 14, 881-899
- ZIMMERMANN, U., G. PILWAT, F. RIEMANN, 1974b
 Reversibler elektrischer Durchbruch von Zellmembranen in elektrostatischen Feldern
 Z. Naturforsch. 29c, 304-305

ZIMMERMANN, U., P. SCHEURICH, 1981

High frequency fusion of plant protoplasts by electric fields

Planta 151, 26-32

ZIMMERMANN, U., J. VIENKEN, 1982

Electric field-induced cell-to-cell fusion

J. Membrane Biol. 67, 165-182

ZIMMERMANN, U., J. VIENKEN, G. PILWAT, 1980

Development of drug carrier systems:

Electrical field induced effects in cell membranes

Bioelectrochem. Bioenerg. 7, 553-574

ZIMMERMANN, U., P. SCHEURICH, G. PILWAT, R. BENZ, 1981

Zellen mit manipulierten Funktionen:

Neue Perspektiven für Zellbiologie, Medizin und Technik

Angew. Chem. 93, 332-351

ZIMMERMANN, U., J. VIENKEN, G. PILWAT, 1984a

Electrofusion of cells

In: Investigative Microtechniques in Medicine and Biology 1, ed. CHAYEN, J., L. BITENSKI

New York, Basel: Dekker, 89-167

ZIMMERMANN, U., J. VIENKEN, G. PILWAT, W.M. ARNOLD, 1984b

Electro-fusion of cells: principles and potential for the future

In: Cell Fusion: Ciba foundation symposium 103, ed. EVERED, R., J. WHELAN

London: Pitman, 60-85

Herrn Prof. Dr. Dr. habil. G. Brem danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, für die stets gewährte, einsatzfreudige Unterstützung, sowie für die vielen hilfreichen Hinweise und Anregungen bei der Durchführung dieser Arbeit.

Für die immer freundliche und stets gewährte, verlässliche Mitarbeit möchte ich mich bei Frau Tamara Holy, Frau Beate Rengel, Frau Sigrid Müller und Frau Maria Stangl bedanken.

Darüberhinaus gilt mein Dank für die zahlreichen Hilfeleistungen und die freundliche Zusammenarbeit den Doktoranden Frank Leichthammer, Elisabeth Gradl und Bernhard Hofmeister, sowie Frau Dr. Karin Münch.

Für die Bereitstellung der EDV-Auswertungsprogramme bedanke ich mich bei Herrn Stanglmeier.

Der Dr. Dr. h.c. Karl-Eibl-Stiftung, Neustadt/Aisch danke ich für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit.

LEBENS LAUF

Name: Annette Clement-Sengewald, geb. Clement

Familienstand: verheiratet seit 23.10.1987

Geburtsdatum: 23.10.1960

Geburtsort: Stuttgart

Vater: Heinz Erich Leopold Clement,
Architekt, Dipl.Ing. (FH)

Mutter: Margot Clement, geb. Waller,
Schneiderin, Hausfrau

09/1967 - 07/1971: Besuch der Fildergrundschule
in Stuttgart-Möhringen

09/1971 - 06/1980: Besuch des Fanny-Leicht-Gymnasiums
in Stuttgart-Vaihingen

03.06.1980: Reifezeugnis

09/1980 - 01/1986: Studium der Veterinärmedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität München

23.01.1986: Abschluß des dritten Abschnittes der
Tierärztlichen Prüfung

06.03.1986: Approbation als Tierärztin

seit 04/1986: Doktorandin am Institut für Tierzucht und
Tierhygiene der Ludwig-Maximilians-Uni-
versität München

